

Application Serial No.
10/801,342

Patent
12090-03USA



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of: Hyun Jin Hwang et al.

Serial No.: 10/801,342

Filed: March 15, 2004

For: **METHOD AND APPARATUS FOR
AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES
BY USING THERMAL CONVECTION**

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

) Group Art Unit: 1637
)
) Examiner: Pande, Suchira
)
) Confirmation No.: 2316
)
)

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

Sir:

Enclosed herewith are priority documents Korean Patent Application Nos. 10-2001-0057040 and 10-2001-0066943 in the present application. Also enclosed are English language translations thereof and their Translators' Certificates attesting to the accuracy of the translations.

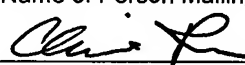
The Commissioner is authorized to charge JHK Law's Deposit Account No. 502486 for any fees required under 37 CFR §§1.16 and 1.17 that are not covered, in whole or in part, by a credit card payment form submitted herewith and to credit any overpayment to said Deposit Account No. 502486.

CERTIFICATE OF MAILING
(37 C.F.R. § 1.10)

I hereby certify that this paper (along with any referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as "Priority Mail Post Office to Addressee" in an envelope addressed to Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

October 26, 2007
Date of Deposit

Claire Rhee
Name of Person Mailing Paper


Signature of Person Mailing Paper

Application Serial No.
10/801,342

Patent
12090-03USA

Respectfully submitted,

JHK Law

Dated: October 26, 2007

By: Joseph Hyosuk Kim
Joseph Hyosuk Kim, Ph.D.
Registration No. 41,425

JHK Law
P.O. Box 1078
La Canada, CA 91012-1078
Telephone: (818) 249-8177; Facsimile: (818) 249-8277

TRANSLATION OF PRIORITY DOCUMENT

I, Hyun Jin HWANG, hereinafter called the translator, residing No. 102-701 JoongAng Heights Apt., 14-1 Samsung-dong, Seoul 135-507, Republic of Korea, do hereby declare that I have translated faithfully the certified copy of the application entitled METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES USING IMMOBILIZED DNA POLYMERASE having a Korean application No. 10-2001-0066943, filed on October 30, 2001, into English.

This 12th day of JAN., 2007

Translator: Hyun Jin Hwang
Hyun Jin HWANG

* Enclosure: Translation of Priority Document

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office

Application Number: 10-2001-0066943

Date of Application: OCT 30, 2001

Applicant(s): AHRAM BIOSYSTEMS INC.

December 28, 2006

COMMISSIONER

【RECORDS】

【Title of Document】 Patent Application

【Type of Right】 Patent

【Receiver】 Commissioner

【Reference Number】 0001

【Application Date】 2001. 10. 30

【IPC】 C12M

【Title】 METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC
ACID SEQUENCES USING IMMOBILIZED DNA POLYMERASE

【Applicant】

【Name】 AHRAM BIOSYSTEMS INC.

【Applicant's Code】 1-2001-029413-9

【Attorney】

【Name】 KIM, Dongjin

【Attorney's Code】 9-2001-000322-5

【Registration No. for General Power of Attorney】 2001-058416-1

【Inventor】

【Name】 HWANG, Hyun Jin

【Inventor's Code】 4-2001-043548-0

【Inventor】

【Name】 KIM, Jeong Hee

【Inventor's Code】 4-2001-043549-6

【Inventor】

【Name】 JEONG, Kyunghoon

【Resident Reg. No】 730204-1XXXXXXX

【Zip Code】 503-062

【Address】 490-5 Bongseon-2-dong, Nam-gu,
Kwangjoo-Kwangyeok-si

【Nationality】 Republic of Korea

【Examination】 Requested

【Order】 I/We file as above according to Article 42 of the Patent law.

Attorney

KIM, Dongjin (seal)

【Fee】

【Basic Filing Fee】	20 pages	29,000 won
【Additional Filing Fee】	21 pages	21,000 won
【Priority Claiming Fee】	0 case	0 won
【Examination Fee】	12 claims	493,000 won
【Total】		543,000 won
【Cause of Reduction】	Small Entity (70% reduction)	
【Reduced Fee】		162,900 won

【Attached Documents】	1. Abstract, Specification (Drawings)	1 copy
	2. Proof for a Small Entity	1 copy

ABSTRACT

The present invention generally relates to methods and apparatuses for amplifying nucleic acid sequences using immobilized DNA polymerase. The present invention provides those methods and apparatuses that allow simple separation and recovery of the DNA polymerase after the amplification, that can be operated not only with thermostable DNA polymerases but also with non-thermostable DNA polymerases, and that are simpler in their designs and processes so that they can be readily integrated into complex devices such as Lab-on-a-chip. The present invention provides a method comprising a) a step of maintaining a first reaction region at a temperature range suitable for separating double stranded DNA molecules into single stranded DNA molecules, a second reaction region at a temperature range suitable for hybridization of the single stranded DNA molecules with primers that are complementary to specific portions of the single stranded DNA molecules so as to form partially double stranded DNA molecules, and a third reaction region at a temperature range suitable for DNA polymerization reaction of the primers in the partially double stranded DNA molecules so as to generate primer extension products; b) a step of positioning an immobilized DNA polymerase in the third reaction region; and c) a step of circulating the DNA molecules through the first, second, and third reaction regions to make amplification of the target DNA sequences occur, wherein the step of circulating the DNA molecules is repeated at least once.

REPRESENTATIVE DRAWING

Figure 2a

KEY WORDS

Nucleic acid sequence amplification, immobilized DNA polymerase, polymerase chain reaction

TITLE OF THE INVENTION

METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES
USING IMMOBILIZED DNA POLYMERASE

5

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows schematic diagrams illustrating the concepts of the nucleic acid amplification methods using immobilized DNA (deoxyribonucleic acid) polymerase according to the present invention.

10 Figure 2a shows a schematic diagram of the nucleic acid amplification method using immobilized DNA polymerase wherein circulation of DNA is induced by thermal convection.

Figure 2b and 2c show a perspective view and a cross sectional view, respectively, of the nucleic acid sequence amplification apparatus using immobilized DNA polymerase wherein circulation of DNA is induced by thermal convection.

15 Figures 3a and 3b show schematic diagrams of the nucleic acid sequence amplification methods using immobilized DNA polymerase wherein circulation of DNA is induced by an electric field generating means.

Figure 4 shows a schematic diagram of the nucleic acid sequence amplification method using immobilized DNA polymerase wherein circulation of DNA is induced by a
20 pressure difference generating means.

Figure 5 shows a schematic diagram of the nucleic acid sequence amplification method using immobilized DNA polymerase wherein circulation of DNA is induced by an agitating means.

25 Figure 6 shows an example of a temperature distribution for the case of forming three reaction regions in the sample according to the present invention.

Figure 7 is a photograph of agarose gel electrophoresis results showing results of the nucleic acid sequence amplification using an immobilized DNA polymerase according to the present invention.

30 Explanation on the numbers of the important parts in the drawings

1: First reaction region

- 2: Second reaction region
- 3: Third reaction region
- 4: Immobilized DNA polymerase
- 5: Reaction vessel
- 5 6: Rectangular wave generator
- 7, 7': Electrode
- 8, 8': Piston
- 9: Magnetic bar
- 10: Electromagnet-type agitating device
- 10 101: First conduction block
- 102: Second conduction block
- 103: Reaction vessel
- 104: Heating device
- 105: Inlet of temperature control fluid
- 15 106: Outlet of temperature control fluid
- 107: Insulator
- 111, 117: Through hole
- 112: Opening

20

FILED OF THE INVENTION AND BACKGROUND ART

The present invention generally relates to methods and apparatuses for amplifying nucleic acid sequences using immobilized DNA polymerase. More particularly, it relates to methods and apparatuses useful for amplifying target nucleic acid sequences by forming a plurality of reaction regions in which polymerase chain reaction (PCR) can occur, positioning
 25 immobilized DNA polymerase in a specific reaction region, and circulating DNA through the reaction regions.

Nucleic acid sequence amplification technology has a wide application in bioscience,
 30 genetic engineering, and medical science for research and development and diagnostic purposes. In particular, the nucleic acid sequence amplification technology using PCR

(hereafter referred to as "PCR amplification technology") has been most widely utilized. Details of the PCR amplification technology have been disclosed in US Pat. No. 4,683,202; 4,683,195; 4,800,159; and 4,965,188.

5 Various apparatuses and methods incorporating automated PCR amplification processes have been developed and used for fast and efficient amplification of a variety of genetic samples. The basic working principle of such technology is as follows.

10 In the commercialized PCR amplification technology, a sample is prepared to contain a template DNA to be amplified, a pair of oligonucleotide primers complementary to a specific sequence of each single strand of the template DNA, a thermostable DNA polymerase, and deoxyribonucleotide triphosphates (dNTP). A specific portion of the nucleic acid sequence of the template DNA is then amplified by repeating a temperature cycle that sequentially changes the temperature of the sample. Typically, the temperature cycle
15 consists of three or two temperature steps, and the amplification processes during the temperature cycle occur in the following manner. The first step is the denaturation step in which the sample is heated to a high temperature and double stranded DNA molecules become separated into single stranded DNA molecules. The second step is the annealing step in which the sample is cooled to a low temperature and the single stranded DNA
20 molecules formed in the first step bind to the primers, forming partially double stranded DNA-primer complexes. The last step is the polymerization step in which the sample is maintained at a suitable temperature and the primers in the DNA-primer complexes are extended by the action of the DNA polymerase, generating new single stranded DNA molecules that are complementary to each of the template DNA strands. The target nucleic
25 acid sequences as selected by the sequences of the two primers are replicated during each cycle consisting of the above three steps. Typically, several millions or higher number of copies of the target nucleic acid sequences can be produced by repeating the temperature cycles for about 20 to 40 times.

30 The temperature of the denaturation step is typically 90~94°C. The temperature of the annealing step is controlled appropriately according to the melting temperatures (T_m) of

the primers used, and it typically ranges from 40 to 60°C. It is typical to set the temperature of the polymerization step to 72°C and use a three-step temperature cycle, since the most frequently used *Taq* DNA polymerase (a thermostable DNA polymerase extracted from *Thermus aquaticus*) has its optimal activity at that temperature. A two-step temperature cycle in which the polymerization temperature is set to the same as the annealing temperature, can also be used since the *Taq* DNA polymerase has its polymerase activity in a broad temperature range.

The prior nucleic acid sequence amplification methods have a number of drawbacks as they operate to change the temperature of the whole sample including DNA polymerase according to the three- or two-step temperature cycle.

Firstly, since DNA polymerase is included in the sample in the prior nucleic acid amplification methods, it is not simple to remove the DNA polymerase for purification of the sample after the amplification reaction, and also difficult to reuse the used enzyme.

Secondly, the prior nucleic acid sequence amplification methods can only use thermostable DNA polymerases such as *Taq* DNA polymerase. This is because the prior apparatuses have the process of heating the whole sample to a high temperature.

Thirdly, it is difficult to incorporate the prior nucleic acid sequence amplification method into a complex device such as Lab-on-a-chip, a miniaturized device that can perform multiple reactions and processes within a chip either simultaneously or sequentially. The prior nucleic acid sequence amplification method is disadvantageous for miniaturization since it requires processes of changing the temperature of the whole sample, thereby having a complex design and processes. Moreover, it is difficult to incorporate the prior method into a complex device in which rapid temperature change is not desirable.

Among various possibilities, a method useful for resolving the problems described above is one using immobilized DNA polymerase. By the term "immobilized enzyme" is meant an enzyme that is physically or chemically bound to a supporting material with its

enzyme activity preserved. There are generally a number of advantages of using immobilized enzymes. Firstly, the sample purification process can be simplified since the enzyme can be readily separated and recovered from the reaction solution by removing the supporting material to which the enzyme is immobilized. Secondly, the cost can be reduced since the recovered immobilized enzyme can be reused. Thirdly, the efficiency of the reaction processes can be improved since multiple reaction processes comprising the enzyme reaction(s) can be simplified. In addition, immobilization of the enzyme may result in incidental effects such as improvement of the physical stability of the enzyme or change in the reaction conditions of the enzyme, which in turn may improve the applicability of the enzyme. Therefore, one can expect that the problems associated with the prior nucleic acid amplification methods described above can possibly be resolved by using immobilized DNA polymerase.

However, no method using an immobilized enzyme has been known yet in the prior art to solve the above problems. This is mainly due to two reasons: difficulty in preserving the activity of the immobilized enzyme and development of processes suitable for using the immobilized enzyme. Firstly, various methods has been reported for immobilization of enzymes, but no method has been reported yet for preparation of the immobilized DNA polymerase having high enough activity to produce detectable amount of reaction products in the PCR process. Therefore, in order to realize a nucleic acid amplification method and an apparatus thereof, a method should be developed first to prepare an immobilized DNA polymerase with its activity highly preserved. Secondly, even if an immobilized DNA polymerase preserving a high activity can be used, the prior methods of the temperature cycle type have limitations. For instance, non-thermostable DNA polymerases cannot be used in the prior temperature cycle type methods because the prior methods require a step of heating the whole sample to a high temperature. Moreover, in the prior methods, the polymerization reaction by DNA polymerase can occur only in one temperature step, namely the polymerization step. That is, the polymerization reaction can only occur for a partial period of the total reaction time. The temporal efficiency of the prior methods is thus limited by the speed of changing the temperature during the temperature cycle. Therefore, it is necessary to develop a new nucleic acid sequence amplification method and an apparatus thereof that

are not of the prior temperature cycle type in which temperature of the whole sample is changed sequentially, but that are of a different type in which the advantages of using the immobilized DNA polymerase can be incorporated.

5

TECHNICAL OBJECT OF THE INVENTION

It is an objective of the present invention to provide new methods and apparatuses for amplifying nucleic acid sequences using immobilized DNA polymerase.

10

More particularly, it is an objective of the present invention to provide nucleic acid sequence amplification methods and apparatuses thereof, wherein immobilized DNA polymerase is used and thus the DNA polymerase can be readily separated and recovered after amplification. The present invention thus provides nucleic acid amplification methods and apparatuses that allow easy purification of the sample and reuse of the DNA polymerase.

15

It is another objective of the present invention to provide nucleic acid sequence amplification methods and apparatuses using immobilized DNA polymerase, wherein not only thermostable DNA polymerases but also non-thermostable DNA polymerases can be used. As various DNA polymerases can be used, the nucleic acid amplification methods and apparatuses of the present invention can be used for a wider range of applications. In particular, it is an objective of the present invention to provide nucleic acid amplification methods and apparatuses, wherein non-thermostable DNA polymerases can be used so that the accuracy of the nucleic acid replication can be improved.

20

25

It is another objective of the present invention to provide nucleic acid sequence amplification methods and apparatuses using immobilized DNA polymerase that are simple in their designs and processes. This can be accomplished by providing methods and apparatuses that do not require the temperature change processes incorporated in the prior nucleic acid sequence amplification methods and apparatuses. The present invention thus provide methods and apparatuses that can be readily miniaturized and also integrated into a complex device such as Lab-on-a-chip as compared to the prior methods and apparatuses.

30

Others objects and advantages of the invention will become clear to those skilled in the art from the following detailed description, claims, and drawings.

5

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In order to achieve the above objectives, the present invention provides new nucleic acid sequence amplification methods and apparatuses using immobilized DNA polymerase as described below.

10

More particularly, the present invention provides a method useful for amplifying at least one target DNA sequence using PCR, which method comprises:

- a) a step of maintaining a first reaction region at a temperature range suitable for separating double stranded DNA molecules into single stranded DNA molecules,
15 a second reaction region at a temperature range suitable for hybridization of the single stranded DNA molecules with primers that are complementary to specific portions of the single stranded DNA molecules so as to form partially double stranded DNA molecules, and
- a third reaction region at a temperature range suitable for DNA polymerization
20 reaction of the primers in the partially double stranded DNA molecules so as to generate primer extension products;
- b) a step of positioning an immobilized DNA polymerase in the third reaction region; and
- c) a step of circulating the DNA molecules through the first, second, and third reaction
25 regions to make amplification of the target DNA sequences occur, wherein the step of circulating the DNA molecules is repeated at least once.

The present invention also provides an apparatus useful for amplifying at least one target DNA sequence using PCR, which apparatus comprises:

30

- a) a reaction vessel;
- b) means for maintaining a first reaction region of the reaction vessel at a temperature

range suitable for separating double stranded DNA molecules into single stranded DNA molecules,

a second reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for hybridization of the single stranded DNA molecules with primers that are complementary to specific portions of the single stranded DNA molecules so as to form partially double stranded DNA molecules, and

a third reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for DNA polymerization reaction of the primers in the partially double stranded DNA molecules so as to generate primer extension products; and

c) means for circulating the DNA molecules through the first, second, and third reaction regions to make amplification of the target DNA sequences occur, wherein an immobilized DNA polymerase is positioned in the third reaction region and the circulating means circulates the DNA molecules repeatedly at least once.

The present invention also provides an apparatus useful for amplifying at least one target DNA sequence using PCR, which apparatus comprises:

a) a reaction vessel; and

b) means for maintaining a first reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for separating double stranded DNA molecules into single stranded DNA molecules,

a second reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for hybridization of the single stranded DNA molecules with primers that are complementary to specific portions of the single stranded DNA molecules so as to form partially double stranded DNA molecules, and

a third reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for DNA polymerization reaction of the primers in the partially double stranded DNA molecules so as to generate primer extension products; and wherein an immobilized DNA polymerase is positioned in the third reaction region and among the first, second, and third reaction regions, a relatively high temperature region is located lower in height than a relatively low temperature region so that the DNA molecules are circulated repeatedly at least once by thermal convection

through the first, second, and third regions to make amplification of the target DNA sequences occur.

The term "immobilized DNA polymerase" as used herein is meant a DNA polymerase that is immobilized on a solid support with its polymerase activity preserved. Various methods may be used to prepare the immobilized DNA polymerase, but it should provide an immobilized DNA polymerase that has a high enough polymerase activity so as to enable detection of nucleic acid sequences amplified by PCR of template DNA molecules. The immobilized DNA polymerase used in the example of the present invention was prepared to preserve a high polymerase activity by using a method in which the active site of the DNA polymerase was masked by a DNA substrate and immobilized on a Au surface by covalent bonding. Detailed procedure of the immobilization method is described in the example. The polymerase activity of the immobilized enzyme as prepared by this method was high enough (about 60~80% compared to the solution phase DNA polymerase) to use for PCR. However, immobilized DNA polymerases that can be used with the present invention are not limited to those prepared by the method used in the example of the present invention, but include those prepared by other methods.

In general, the sample used in nucleic acid sequence amplification methods using DNA polymerase comprises a template DNA, four deoxynucleotide triphosphates consisting of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP which act as substrates, primers for initiating the polymerization, and a DNA polymerase for catalyzing the polymerization as dissolved in a buffer solution having a suitable salt concentration and pH.

The sample used in the present invention is different in its composition from the sample used in the prior nucleic acid sequence amplification methods. Different from the prior methods where the DNA polymerase is dissolved together in the aqueous sample, the DNA polymerase is not included in the aqueous sample in the present invention since a DNA polymerase that is immobilized on a solid support is used. Therefore, different from the prior methods, it is advantageous that separation of the enzyme and purification of the sample can be easily performed and the enzyme can be reused.

The template DNA used in the present invention may be single stranded, double stranded, or partially double stranded, and it may be a mixture of various DNA molecules having different lengths and shapes. When a nucleic acid sequence of a messenger ribonucleic acid (mRNA) contained in a sample needs to be amplified, a complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) typically prepared by converting the RNA to a DNA using a reverse-transcriptase may also be used as a template DNA.

The primers used in the present invention consist of at least one pair of oligonucleotides each containing a portion of the 5' terminus of one of the target nucleic acid sequences in the double stranded DNA to be amplified. Each of the primer pair is designed to hybridize to the 3' terminus of a complementary target nucleic acid sequence in the template DNA and thus to initiate the DNA polymerization. When the polymerization needs to be performed repeatedly, the primers are added in molar excess to the amount of the substrate. For instance that a target nucleic acid sequence in the template DNA needs to be amplified with a partial modification of the sequence, the primer may be designed to have a nucleic acid sequence having partial substitution or addition of the sequence and thus it may not be completely complementary to the template DNA. As far as the modified primer can form a desired hybridized structure with the template DNA, there is no limitation in using such modified primer. This should be apparent to those having ordinary skill in the art to which the present invention pertains.

The main features of the embodiments according to the present invention are: a plurality of reaction regions each maintained at a specific temperature are formed in the sample, and DNA is subject to circulate through the reaction regions.

The DNA polymerization reaction consists of (1) the denaturation step in which double stranded DNA molecules become separated into single stranded DNA molecules; (2) the annealing step in which the primers hybridize with the single stranded DNA molecules each at a specific complementary region to form partially double stranded DNA molecules; and (3) the polymerization step in which the primer extension products are synthesized from

the partially double stranded DNA molecules. Amplification of nucleic acid sequences can be achieved by making these three steps occur sequentially and repeatedly. In the prior nucleic acid sequence amplification methods, the above steps are accomplished by changing the temperature of the whole sample sequentially according to the temperature cycle.

5

In the present invention, however, the above steps are accomplished by forming a plurality of reaction regions each maintained at a specific temperature suitable for each of the above steps and circulating DNA through the reaction regions. The reaction regions consists of 1) a first reaction region maintained at a temperature range suitable for separating double stranded DNA molecules into single stranded DNA molecules, 2) a second reaction region maintained at a temperature range suitable for hybridization of the single stranded DNA molecules with primers that are complementary to specific portions of the single stranded DNA molecules so as to form partially double stranded DNA molecules, and 3) a third reaction region maintained at a temperature range suitable for polymerization of the primers in the partially double stranded DNA molecules so as to generate primer extension products. The three reaction regions and their temperature ranges may overlap each other either partially or completely.

The DNA molecules become denatured into single stranded DNA molecules in the first reaction region and anneal with the primers in the second reaction region. An immobilized DNA polymerase is positioned in the third reaction region to make the polymerization occur, thereby generating the primer extension products. The primer extension products thus generated may have the same nucleic acid sequences, or partially substituted or added sequences as compared to the specific portions of the template DNA molecules, depending on the compositions of the primers. Once the PCR process occurs, the primer extension products in addition to the template DNA molecules can also act as templates. Therefore, nucleic acid sequences having the same sequences as the primer extension products are thus amplified afterward.

In the present invention, DNA molecules are circulated through the first, second, and third reaction regions so that amplification of specific nucleic acid sequences can occur. The

DNA molecules to be circulated include the primer extension products in addition to the template DNA molecules. These DNA molecules are those that are circulated repeatedly through the reaction regions. Other entities of the sample such as the buffer, deoxyribonucleotide triphosphates, etc. may be located in each of the reaction regions or they may be circulated together with the above DNA molecules. By the clause "the DNA molecules are circulated so that amplification of specific nucleic acid sequences can occur" is meant that the DNA molecules are circulated through the three reaction regions at least once for each of the reaction regions so that the PCR process can occur.

The enzyme that is immobilized in the present invention is an enzyme that has a polymerase activity of replicating a sequence complementary to a template DNA. Such enzyme may be selected from the group consisting of *E. Coli* DNA polymerase I, *Klenow* fragment of *E. Coli* DNA polymerase I, T4 DNA polymerase, *Taq* DNA polymerase, and their homologs and derivatives.

Since the prior DNA sequence amplification methods and apparatuses of the temperature cycle type incorporate the step of heating the whole sample to a high temperature, enzymes that are thermostable may only be used practically for the polymerization. If the enzyme used is not thermostable, the enzyme should be added for each temperature cycle due to the heat-induced loss of the enzyme activity. In the present invention, such problem of heat-induced damaging of DNA polymerase is resolved by locating an immobilized DNA polymerase in a region at a specific temperature range (e.g., the third reaction region). More specifically, the enzyme is located in a reaction region maintained at a temperature range suitable for the polymerization, thereby avoiding the undesirable effect due to the denaturation process that requires a high temperature above 90°C. Since the DNA polymerase is not exposed to a high temperature, DNA polymerases that are not thermostable can also be used in the present invention.

The objectives, features and advantages described above will be apparent from the following detailed description provided in connection with the attached drawings. In describing the present invention, detailed explanation on the related prior art will be omitted

when it can unnecessarily make the points of the present invention ambiguous. Below, preferred embodiments according to the present invention are explained in detail with reference to the attached drawings.

5 Figure 1 shows schematic diagrams illustrating the concepts of the nucleic acid amplification methods using immobilized DNA polymerase according to the present invention. In one embodiment as illustrated in Figure 1a, the first reaction region 1 is maintained at a temperature range suitable for separating double stranded DNA molecules into single stranded DNA molecules, the second reaction region 2 is maintained at a temperature range suitable for
10 hybridization of the single stranded DNA molecules with primers that are complementary to specific portions of the single stranded DNA molecules so as to form partially double stranded DNA molecules, and the third reaction region 3 is maintained at a temperature range suitable for polymerization of the primers in the partially double stranded DNA molecules so as to generate primer extension products. In this embodiment, an immobilized DNA polymerase
15 is positioned in the third reaction region and the DNA molecules are circulated through the first, second, and third reaction regions. In some embodiments of the present invention, some of the reaction regions may overlap each other (Figure 1b), and also positions of the reaction regions may be changed (Figure 1c) to facilitate the circulation of the DNA molecules through the reaction regions.

20 One embodiment of the present invention is explained more specifically below for the case of using *Taq* DNA polymerase, with reference to Figure 1a.

 The first reaction region maintained at 90~94°C for denaturation is positioned at the
25 lowest height and the second reaction region maintained at 40~60°C for annealing of the primers is positioned at the highest height. The third reaction region maintained at the optimum temperature of *Taq* DNA polymerase, e.g., 72°C, is positioned in the middle in between the first and second reaction regions. When the reaction regions are arranged as described above, circulation of the DNA molecules can be achieved by a thermal convection
30 generated by the temperature gradient, since the relatively high temperature region is positioned lower in height than the relatively low temperature region.

More specifically, the denaturation step occurs first in the first reaction region 1. The denatured DNA molecules then move to the second reaction region 2 via thermal convection in the presence of the primers, causing the annealing step to occur subsequently. The polymerization step finally takes place in the third reaction region 3 by the action of the immobilized DNA polymerase 4, when the DNA-primer complexes move through the third reaction region via thermal convection. Consequently, the three steps of the PCR process, the denaturation, annealing, and polymerization steps, can occur sequentially and repeatedly, thereby achieving an efficient amplification of the target nucleic acid sequences from the sample DNA.

Another embodiment of the present invention is explained below for the case of using *Taq* DNA polymerase with reference to Figure 1b. *Taq* DNA polymerase is known to have its optimal activity at 72°C and its activity remaining in a broad temperature range extending to a low temperature region. Therefore, if *Taq* DNA polymerase is to be used, the second and third reaction regions may be positioned at the same location by selecting the temperature ranges for the polymerization and the annealing to be the same, as depicted in Figure 1b. Circulation of the DNA in this example can also be achieved by thermal convection generated by the temperature gradient.

Another embodiment of the present invention is explained below for the case of using immobilized *E. Coli* DNA polymerase with reference to Figure 1c. *E. Coli* DNA polymerase has its optimal activity at 37°C, which is lower than the annealing temperature of the primer. Therefore, if *E. Coli* DNA polymerase is to be used, it is preferred that the third reaction region where the polymerization occurs be positioned higher in height than the second reaction region where the annealing occurs, as depicted in Figure 1c. Circulation of the DNA molecules in this example can also be achieved by thermal convection generated by the temperature gradient.

In the embodiments depicted in Figure 1a, 1b, and 1c, arrangement of the temperatures of the reaction regions 1, 2, and 3 each maintained at a specific temperature range, may not be

suitable for generating thermal convection. For such instance, an additional means may be used to circulate the DNA molecules.

Figure 2a shows one embodiment of the present invention that was used in the example to circulate the DNA molecules by thermal convection. In this embodiment, the relatively high temperature region is positioned lower in height than the relatively low temperature region and the second and third reaction regions overlap partially each other.

As shown in Figure 2b and 2c, the first conduction block 101 located at the lower position is maintained at a high temperature and the second conduction block 102 located at the higher position is maintained at a low temperature. The two conduction blocks 101 and 102 are thermally insulated each other by using an insulator 107. Under this arrangement, three temperature regions are formed inside the reaction vessel 103 which consist of the first reaction region 1 maintained at a high temperature, the second reaction region 2 maintained at a low temperature, and the third reaction region 3 generated as a result of the temperature gradient between the first and second reaction regions. In this embodiment, the sample in the high temperature region has a lower density than that in the low temperature region. Therefore, a buoyant force is generated and it causes DNA to move from the high temperature region located at the lower position to the low temperature region located at the higher position, while the gravitational force causes DNA to move in the opposite direction. A natural thermal convection is thus generated by the temperature difference, resulting in circulation of DNA through a plurality of the reaction regions 1, 2, and 3. The heating unit 104 used to maintain the first conduction block 101 at the high temperature is depicted only schematically as a block, and a circulating water bath used to maintain the second conduction block 102 at the low temperature is not shown. Details of such embodiment should be apparent to those skilled in the art to which the present invention pertains. In this particular example, two conduction blocks 1 and 2, a heating unit, and a circulating water bath are used as means for maintaining the temperatures of the first, second, and third reaction regions at specific temperature ranges. However, the temperature maintaining means are not limited to the conduction blocks 1 and 2, the heating unit, and the circulating water bath. For instance, instead of the conduction block, a fluid such as liquid or gas at a suitable temperature may be

contacted to a specific portion of the reaction vessel or an infrared radiation generating means may be used to directly heat the sample in order to generate a reaction region. Detailed composition of the temperature maintaining means can be modified in various ways depending on the change in the reality of the industrial technology. Any such modifications are obviously included in the scope of the present invention as long as the first, second, third reaction regions can be maintained at the specific temperature ranges.

Figures 3a and 3b depict other embodiments of the present invention, wherein an electric field is used to circulate DNA.

DNA has various functional groups having charges in their structures. However, in overall, DNA has a large quantity of negative charges in buffer solution at near neutral pH, because the nucleotides each having three phosphates affect the charge state of DNA most significantly. Therefore, as depicted in Figure 3a and 3b, electrodes 7 and 7' may be introduced to both end regions 1 and 3 of the sample solution and an electric potential difference may be generated and altered periodically inside the sample using a rectangular wave generator 6. By such arrangement, DNA having negative charges can be circulated through each of the reaction regions 1, 2, and 3 sequentially, thereby accomplishing amplification of nucleic acid sequences. Although not shown in Figure 3a and 3b, electrodes may be introduced in each and every one of the reaction regions 1, 2, and 3, or the arrangement of the reaction regions may also be modified.

DNA used as a substrate is the main object of the denaturation, annealing, and polymerization occurring in the DNA polymerization process. Therefore, DNA should be the one that needs to be circulated through the reaction regions. When electric field is applied to induce movement of DNA, the primers and deoxyribonucleotide triphosphates included in the sample may also move at the same time. However, this also provides conditions preferable for the annealing and polymerization of DNA since these entities also act as substrates and become concentrated in each relevant reaction region. The strength of the electric field and its duration may be selected depending on the size of DNA and the shape of the reaction vessel. If the polymerase is immobilized on a metal surface, the immobilized

DNA polymerase itself may be used as an electrode. Detailed embodiments are not limited to those depicted in Figure 3a and 3b, but they can be modified depending on the reaction process, the characteristics of the sample, and the shape of the reaction vessel.

5 Figure 4 depicts another embodiment of the nucleic acid sequence amplification method according to the present invention, wherein the step of circulating DNA is accomplished by a pressure difference generating means.

10 As exemplified in Figure 4, DNA may be circulated through the reaction regions 1, 2, and 3 maintained at specific temperature ranges by generating a pressure difference. The pressure difference may be generated by controlling the pressure applied on one end of the sample inside the reaction vessel 5 higher or lower than that on the other end. Figure 4 shows a particular example in which pistons 8 and 8' are used to induce a round trip motion. People having ordinary skill in the art to which the present invention pertains can readily
15 recognize that various kinds of liquid or gas pumps may be used in replacement of the pistons 8 and 8' as long as they can generate the desired pressure difference.

20 Figure 5 depicts another embodiment of the nucleic acid sequence amplification method according to the present invention, wherein the step of circulating DNA is accomplished by an agitating means.

25 As exemplified in Figure 5, a magnetic bar 9 may be introduced in the reaction vessel 5 and rotated using an electromagnet-type agitating device 10 to make DNA move. Other agitating device such as a propeller type agitator or a vibrating thin-film agitator that is in contact with the sample solution may also be used to accomplish the purpose of the present invention.

Example

30 A. Preparation of the immobilized DNA polymerase

The 65 base single stranded DNA and the KS primer shown below were mixed in a pH

8.3 phosphate buffer at 1:1 molar ratio. The resulting solution was incubated at 94°C for 10 min and then cooled down slowly below 35°C. During this process, the 65 base single stranded DNA and the KS primer were annealed each other to form a partially double stranded DNA. An appropriate number of moles of *Taq* DNA polymerase (AmpliTaq Gold) purchased from Perkin Elmer (U.S.A.) was then added to this solution and the resulting mixture was incubated in a dry bath at 72°C for 10 min. Then, the mixture was moved to a dry bath at 50°C and incubated for 20 min to finish preparation of a masked DNA polymerase in which the partially double stranded DNA become bound to the active site of the DNA polymerase.

KS primer: 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3'

65-mer:

3'-CCAGCTGCCATAGCTATTTTCTTTTCTTTCTTAAGTTCTTTTCTTTTCCTAG
GTGATCAAGATCT-5'

In order to have a maximum amount of immobilized DNA polymerase be 0.26 pmol, a Au wire having an outer diameter of 0.1 mm and a length of 4.7 cm was prepared and used after manipulating it to a coil shape having an outer diameter of 1.5 mm and a length of about 4 mm. In order to ensure the cleanness of the surface of the Au wire, it was washed with Piranha solution for 10~15 min at 60~70°C and was rinsed with deionized water and subsequently with absolute ethanol, right before using.

In order to introduce reaction groups for immobilization onto the Au surface, a monolayer of thiol molecules was formed on the Au surface by using the Au-S bond formation reaction, that is, by using the thiolate formation reaction between a linker molecule having a thiol group and Au, to prepare a supporting material. In this reaction, a mixed solution containing two kinds of thiol molecules having an immobilization reaction group and a non-reactive group, respectively, was used. The mole fraction of the thiol molecule having the immobilization reaction group with respect to the total moles of the two thiol molecules was selected to be 5%. In order to introduce a carboxyl immobilization reaction group,

12-mercaptododecanoic acid having a relatively long alkyl chain was used as a linker molecule. As a thiol molecule having a non-reactive group, 6-mercapto-1-hexanol or 1-heptanethiol was used as a matrix molecule. The carboxyl immobilization reaction group was introduced onto the surface of the Au wire by placing it in 100 μ l of a 2 mM mixed thiol solution in ethanol for 2 hours at room temperature and washing it with absolute ethanol.

The Au wire on which the carboxyl immobilization reaction groups were introduced was placed in 120 μ l of an ethanol solution containing 10 mM of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) and 5 mM of N-hydroxysuccinimide (NHS) for 2 hours at room temperature. The carboxyl group was activated by reacting with NHS in the presence of EDC and thus forming NHS-ester.

After activating the carboxyl groups of the thiol monolayer, the Au wire was moved to the enzyme solution containing the active-site masked DNA polymerase. In this step, the activated carboxyl (NHS-ester) of the thiol monolayer reacted with the primary amine of the protein, forming an amide bond (-CO-NH-). As a result, the *Taq* DNA polymerase was immobilized on the supporting material.

The activity of the immobilized DNA polymerase was observed to be 60~80% of that of the solution phase DNA polymerase when examined with the prior PCR method of the temperature cycle type.

B. Preparation of the reaction sample

A glass tubing with its one end closed was used as a reaction vessel. The glass tubing had a length of 55~60 mm, an inner diameter of 2 mm, an outer diameter of 8 mm, and a thickness of 3 mm at the bottom-side closed end. The inner wall of the glass tubing was coated with polytetrafluoroethylene using a spray type coating material and thermally hardened.

pBluescript II KS(+) was used as a template DNA to amplify the 164 bp nucleic acid sequence from the nucleotide at the position 627 in the T7 promoter region to the nucleotide

at the position 790 in the T3 promoter region. The sample used in the PCR process contained 40 ng of the template DNA, 40 pmol each of T3 primer (5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3') and T7 primer (5'-AATACGACTCACTATAG-3'), a mixture of 4 nmol of deoxyribonucleotide triphosphates, 250 nmol of MgCl₂, and 50 mM KCl in 10 mM Tris buffer at pH 8.3 with a total volume of 100 μ l. The sample was then introduced into the reaction vessel and the *Taq* DNA polymerase immobilized on the gold wire that was prepared in the step A was positioned in the low temperature region to perform the reaction. As a control for determining the activity of the enzyme after the immobilization, another sample was prepared to have the same composition but with 0.26 pmol of solution phase *Taq* DNA polymerase added, and the PCR process was performed using the prior temperature cycle method.

C. Example of the DNA polymerization

It is explained with reference to Figure 2b and 2c. The first conduction block located at the lower position was maintained at 96°C using an electric heater, and the second conduction block located at the upper position was maintained at 45°C using a circulating water bath. The reaction vessel containing the sample prepared in the step B was inserted into the receptor 111, 117, and 112, and the temperature of each reaction region was measured. From this temperature measurement, it was confirmed (see Figure 6) that the high temperature region maintained above 90°C for the denaturation, the low temperature region maintained at about 50°C for the annealing, and the convection region having a temperature gradient which generate the thermal convection were formed in the sample. Therefore, it is expected that the polymerization will occur in the low temperature region and the upper portion of the convection region.

To carry out the polymerization reaction, the coil-shaped gold wire having an outer diameter of 1.5 mm and a length of 4 mm was inserted into the reaction vessel with its center positioned at a location where the temperature was about 55°C, and the sample was incubated under the reaction conditions described above for a selected reaction time. The reaction vessel was then taken out from the apparatus and allowed to cool down. The reaction products were separated by electrophoresis using a 10% agarose gel and stained with ethidium

bromide. The DNA products were visualized using fluorescence generated by UV irradiation and quantified with a densitometer. Figure 7 is a photograph of the electrophoresis results showing the results obtained at every 30 min reaction time up to 4 hr. The reaction product is a 164 bp double stranded DNA. As can be seen in Figure 7, the PCR process starts to saturate at 120 min.

Those skilled in the art to which the present invention pertains should recognize that the present invention described above is not limited to the foregoing embodiments and the attached drawings and that various substitutions, changes, and modifications are possible without departing from the technical idea of the present invention. Therefore, the foregoing embodiments and the drawings should be taken as examples and should not be interpreted as limitations. The scope of the present invention should be determined by the following claims and is not restricted in any way by the specification.

USEFULNESS OF THE INVENTION

The present invention has the following advantages.

Firstly, by the use of the immobilized DNA polymerase, the present invention makes it possible to reuse the enzyme repeatedly and also to simplify the process of removing the enzyme in a series of processes. This in turn allows to save the cost and to simplify the related processes.

Secondly, the present invention makes it possible to use DNA polymerases that are not thermostable, such as Klenow fragment and T7 DNA polymerase, thereby extending the application range of the nucleic acid sequence amplification method and apparatus. In particular, the present invention provides a solution to improve the accuracy of the polymerization for replicating nucleic acid sequences by making it possible to use such non-thermostable DNA polymerases.

Lastly, the present invention provides nucleic acid sequence amplification methods

and apparatuses thereof that do not require the temperature change processes required in the prior methods and apparatuses. The present invention thus provides the methods and apparatuses that are simpler in their designs and processes and thus that can be readily miniaturized and integrated into complex devices. Moreover, since the present invention
5 makes the polymerization process occur continuously, it provides a means for improving the speed of the nucleic acid sequence amplification.

What is claimed is:

1. A method useful for amplifying at least one target DNA sequence using PCR, which method comprises:

5 a) a step of maintaining a first reaction region at a temperature range suitable for separating double stranded DNA molecules into single stranded DNA molecules, a second reaction region at a temperature range suitable for hybridization of the single stranded DNA molecules with primers that are complementary to specific portions of the single stranded DNA molecules so as to form partially double
10 stranded DNA molecules, and

 a third reaction region at a temperature range suitable for DNA polymerization reaction of the primers in the partially double stranded DNA molecules so as to generate primer extension products;

 b) a step of positioning an immobilized DNA polymerase in the third reaction region;
15 and

 c) a step of circulating the DNA molecules through the first, second, and third reaction regions to make amplification of the target DNA sequences occur, wherein the step of circulating the DNA molecules is repeated at least once.

20 2. The method according to claim 1, wherein the immobilized DNA polymerase is an immobilized enzyme having a polymerase activity of replicating a sequence complementary to a template DNA, selected from the group consisting of *E. Coli* DNA polymerase I, *Klenow* fragment of *E. Coli* DNA polymerase I, T4 DNA polymerase, *Taq* DNA polymerase, and their homologs and derivatives.

25 3. The method according to claim 1, wherein the step of circulating the DNA molecules is induced by thermal convection generated by positioning a relatively high temperature region lower in height than a relatively low temperature region among the first, second, and third reaction regions.

30 4. The method according to claim 1, wherein the step of circulating the DNA molecules is

induced by an electric field generating means.

5. The method according to claim 1, wherein the step of circulating the DNA molecules is induced by a pressure difference generating means.

5

6. The method according to claim 1, wherein the step of circulating the DNA molecules is induced by an agitating means.

7. An apparatus useful for amplifying at least one target DNA sequence using PCR, which apparatus comprises:

10

a) a reaction vessel;

b) means for maintaining a first reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for separating double stranded DNA molecules into single stranded DNA molecules,

15

a second reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for hybridization of the single stranded DNA molecules with primers that are complementary to specific portions of the single stranded DNA molecules so as to form partially double stranded DNA molecules, and

20

a third reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for DNA polymerization reaction of the primers in the partially double stranded DNA molecules so as to generate primer extension products; and

c) means for circulating the DNA molecules through the first, second, and third reaction regions to make amplification of the target DNA sequences occur,

wherein an immobilized DNA polymerase is positioned in the third reaction region and

25

the circulating means circulates the DNA molecules repeatedly at least once.

8. An apparatus useful for amplifying at least one target DNA sequence using PCR, which apparatus comprises:

a) a reaction vessel; and

30

b) means for maintaining a first reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for separating double stranded DNA molecules into single

stranded DNA molecules,

a second reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for hybridization of the single stranded DNA molecules with primers that are complementary to specific portions of the single stranded DNA molecules so as to form partially double stranded DNA molecules, and

a third reaction region of the reaction vessel at a temperature range suitable for DNA polymerization reaction of the primers in the partially double stranded DNA molecules so as to generate primer extension products; and

wherein an immobilized DNA polymerase is positioned in the third reaction region and among the first, second, and third reaction regions, a relatively high temperature region is located lower in height than a relatively low temperature region so that the DNA molecules are circulated repeatedly at least once by thermal convection through the first, second, and third regions to make amplification of the target DNA sequences occur.

9. An apparatus according to any of claims 7 and 8, wherein the immobilized DNA polymerase is an immobilized enzyme having a polymerase activity of replicating a sequence complementary to a template DNA, selected from the group consisting of *E. Coli* DNA polymerase I, *Klenow* fragment of *E. Coli* DNA polymerase I, T4 DNA polymerase, *Taq* DNA polymerase, and their homologs and derivatives.

10. The apparatus according to claim 7, wherein the circulating means consists of an electric field generating means.

11. The apparatus according to claim 7, wherein the circulating means consists of a pressure difference generating means.

12. The apparatus according to claim 7, wherein the circulating means consists of an agitating means.

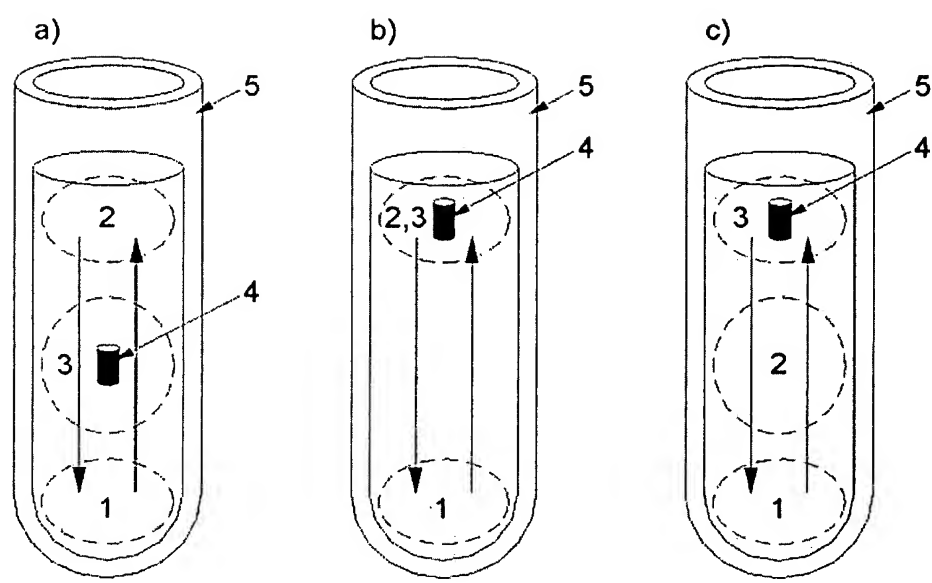


Fig. 1

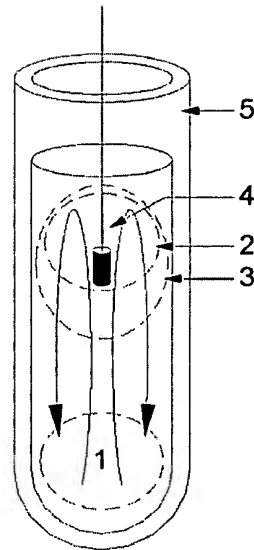


Fig. 2a

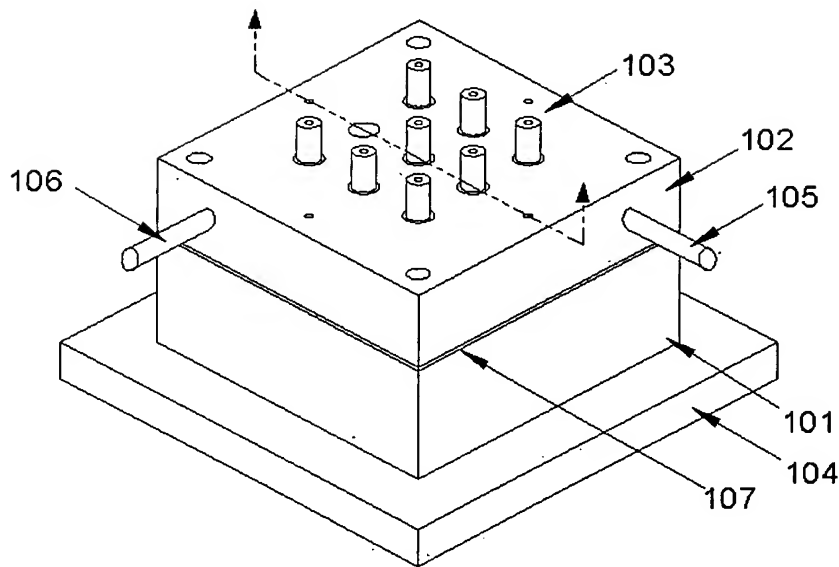


Fig. 2b

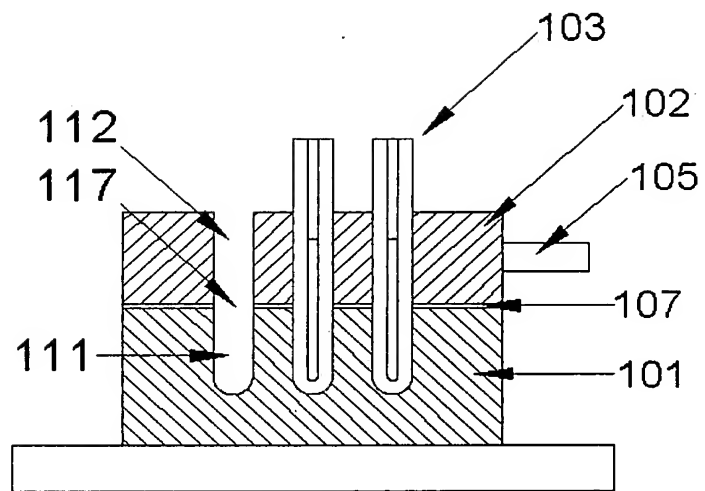


Fig. 2c

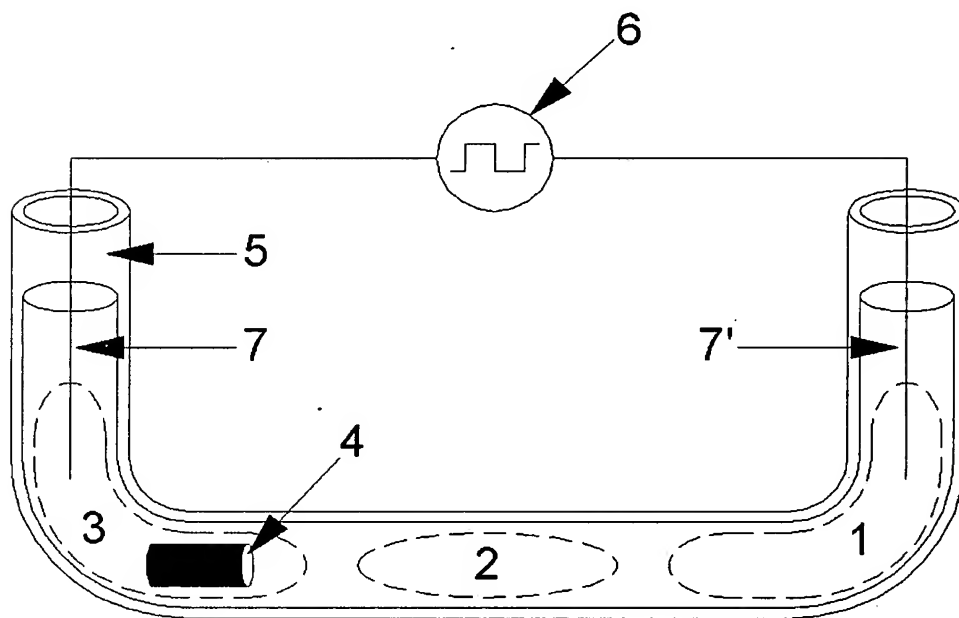


Fig. 3a

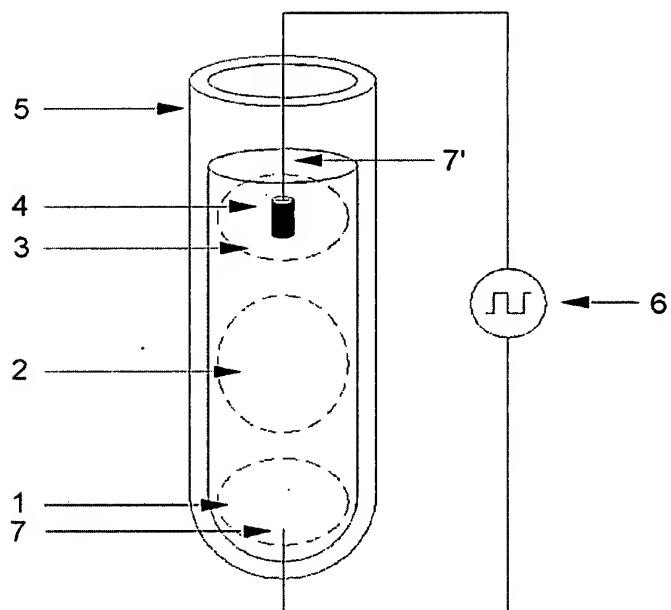


Fig. 3b

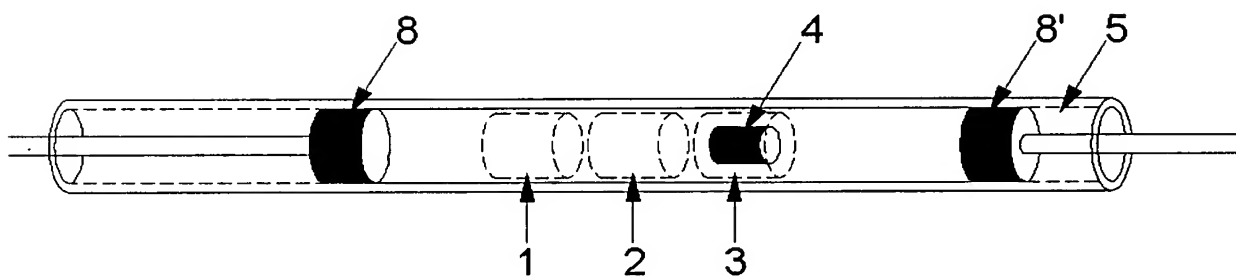


Fig. 4

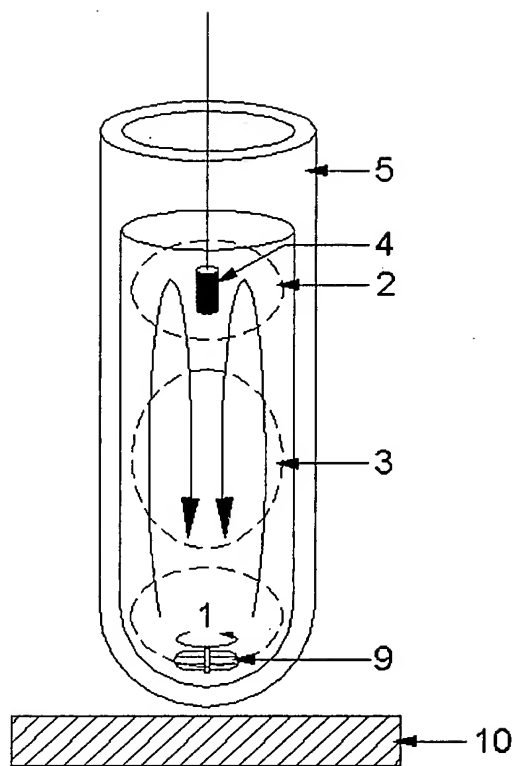
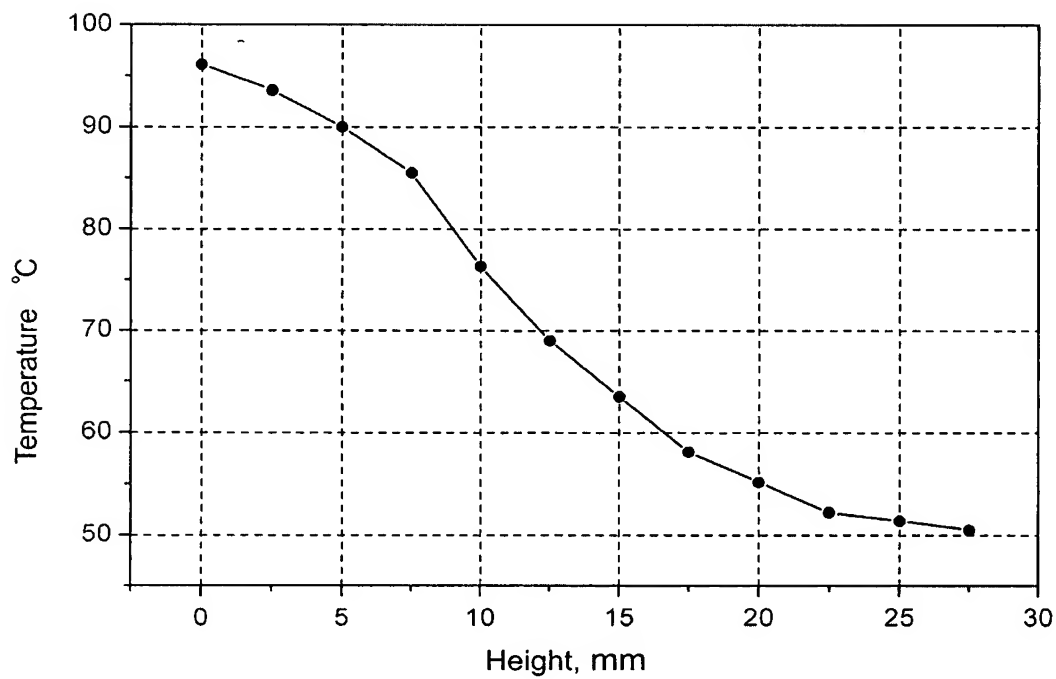
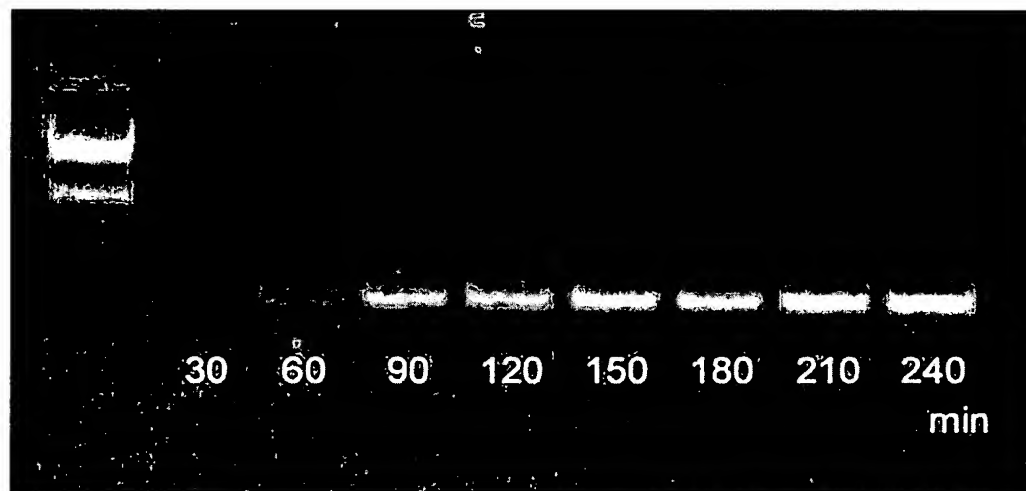
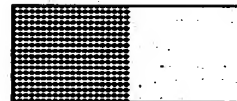


Fig. 5

**Fig. 6****Fig. 7**



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2001-0066943

Application Number

출원 년 월 일 : 2001년 10월 30일

Date of Application OCT 30, 2001

출원인 : 아람 바이오시스템 주식회사

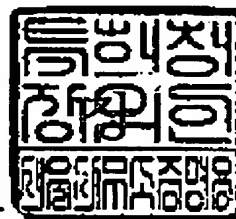
Applicant(s) AHRAM BIOSYSTEMS INC.



2006년 12월 28일

특 허 청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the confirmation by the issue number is available only for 90 days.

**【서지사항】**

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2001.10.30
【국제특허분류】	C12M
【발명의 국문명칭】	고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법 및 장치
【발명의 영문명칭】	METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES USING IMMOBILIZED DNA POLYMERASE
【출원인】	
【명칭】	아람 바이오시스템 주식회사
【출원인코드】	1-2001-029413-9
【대리인】	
【성명】	김동진
【대리인코드】	9-2001-000322-5
【포괄위임등록번호】	2001-058416-1
【발명자】	
【성명】	황현진
【출원인코드】	4-2001-043548-0
【발명자】	
【성명】	김정희
【출원인코드】	4-2001-043549-6
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정경훈
【성명의 영문표기】	JEONG, Kyunghoon
【주민등록번호】	730204-1XXXXXX



【우편번호】 503-062
【주소】 광주광역시 남구 봉선2동 490-5
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

김동진 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	21 면	21,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	12 항	493,000 원
【합계】		543,000 원
【감면사유】	소기업(70%감면)	
【감면후 수수료】	162,900 원	
【첨부서류】	1.요약서·명세서(도면)_1통 2.소기업임을 증명하는 서류_1통	

【요약서】

【요약】

본 발명은 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법 및 장치에 관한 것으로서, 염기서열 증폭 후 디엔에이 중합효소의 분리 및 회수가 간편하고, 고온 안정성을 가진 디엔에이 중합효소 뿐만 아니라 고온 안정성이 아닌 디엔에이 중합효소의 사용도 가능하고, 구성 및 공정이 보다 간단하고 랩온어칩과 같은 복합장치에서의 구현이 용이한 장치 및 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다. 본 발명은 a) 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되기 위한 온도범위로 제 1 반응영역을 유지시키고, 단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적인 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되기 위한 온도범위로 제 2 반응영역을 유지시키고, 상기 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장산물이 디엔에이 중합반응에 의해 합성되기 위한 온도범위로 제 3 반응영역을 유지시키는 단계, b) 고정화된 디엔에이 중합효소를 상기 제 3 반응영역에 위치시키는 단계, 및 c) 특정 디엔에이 염기서열이 증폭될 수 있도록 상기 제 1 반응영역, 상기 제 2 반응영역 및 상기 제 3 반응영역간에 디엔에이를 이동시키는 단계를 포함하며, 상기 디엔에이를 이동시키는 단계를 적어도 1 회 이상 반복하는 것을 특징으로 한다.

【대표도】

도 2a

【색인어】

염기서열 증폭, 고정화된 디엔에이 중합효소, 중합효소 연쇄반응,

【명세서】

【발명의 명칭】

고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법 및 장치{METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES USING IMMOBILIZED DNA POLYMERASE}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도1은 본 발명에 따른 고정화된 디엔에이(Deoxyribonucleic Acid : DNA) 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법의 개념을 나타내는 구성도,
- <2> 도2a는 열 대류에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법의 구성도,
- <3> 도2b 및 도2c는 열 대류에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 장치의 사시도 및 단면도,
- <4> 도3a 및 도3b는 전기장 발생 수단에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법의 구성도,
- <5> 도4는 압력차 발생수단에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법의 구성도,
- <6> 도5는 교반 수단에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법의 구성도,

<7> 도6은 본 발명의 실험 예 중 반응시료 내에 3개의 반응영역을 형성시키는 경우의 온도 분포의 예를 보여주는 도표,

<8> 도7은 본 발명에 의한 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 결과를 보여주는 아가로스 겔 전기영동 사진이다.

<9> <도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>

<10> 1 : 제 1 반응영역

<11> 2 : 제 2 반응영역

<12> 3 : 제 3 반응영역

<13> 4 : 고정화된 디엔에이 중합효소

<14> 5 : 반응용기

<15> 6 : 구형파 발생기

<16> 7, 7' : 전극

<17> 8, 8' : 피스톤

<18> 9 : 자석 막대

<19> 10 : 전자석형 교반 구동 장치

<20> 101 : 제 1 전도성 블록

<21> 102 : 제 2 전도성 블록

- <22> 103 : 반응용기
- <23> 104 : 가열장치
- <24> 105 : 온도 조절 유체 유입부
- <25> 106 : 온도 조절 유체 유출부
- <26> 107 : 단열재
- <27> 111, 117 : 관통구
- <28> 112 : 개구부

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <29> 본 발명은, 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법 및 장치에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction : PCR)이 일어날 수 있는 복수의 반응영역을 형성시키고 그 복수의 반응영역 중 특정 영역에 고정화된 디엔에이 중합효소를 위치시킨 후, 상기 복수의 반응영역들 간에 디엔에이를 이동시킴으로써, 특정 염기서열을 증폭하는 방법 및 장치에 관한 것이다.

- <30> 염기서열 증폭기술은 생명과학, 유전공학, 및 의학 분야 등의 연구 개발 및

진단 목적으로 광범위하게 활용되고 있으며, 특히 중합효소 연쇄반응에 의한 염기서열 증폭기술(이하 'PCR 염기서열 증폭기술'이라 한다)이 널리 활용되고 있다. 상기 PCR 염기서열 증폭기술에 관한 상세한 내용은, 미합중국 특허 제4,683,202호, 제4,683,195호, 제4,800,159호, 및 제4,965,188호에 기재되어 있다.

<31> PCR 염기서열 증폭기술을 자동화하여 여러 종류의 유전자 시료들을 보다 효율적으로 빠른 시간 안에 증폭하기 위한 다양한 장치 및 방법들이 개발되어 사용되고 있는데, 그 기본적인 작동원리는 다음과 같다.

<32> 상용화된 PCR 염기서열 증폭기술에서는, 증폭될 주형 디엔에이(template DNA), 주형 디엔에이의 각 단일가닥의 특정 서열과 상보적인 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프라이머(primer) 쌍, 고온 안정성 디엔에이 중합효소(thermostable DNA polymerase), 및 삼인산화데옥시리보뉴클레오티드(deoxyribonucleotide triphosphates : dNTP)를 포함한 시료를 준비하고, 이 시료의 온도를 순차적으로 변화시키는 온도 사이클을 반복함으로써 주형 디엔에이의 특정 부위 염기서열을 증폭한다. 구체적으로 3단계 또는 2단계의 온도 순환 사이클을 사용하게 되는데, 온도 변화에 의하여 염기서열 증폭을 달성하는 과정은 다음과 같다. 첫 번째 단계는 디내츄레이션 단계(denaturation step)로서, 상기 시료를 고온으로 가열시킴으로써 이중가닥 디엔에이를 단일가닥 디엔에이로 분리하는 단계이다. 두 번째 단계는 어닐링 단계(annealing step)로서, 상기 디내츄레이션

단계를 거친 시료를 적정 온도로 냉각시킴으로써, 상기 단일가닥 디엔에이와 상기 프라이머가 이중 나선 결합을 하여 부분적으로 이중 가닥이 된 디엔에이-프라이머 복합체(DNA-primer complex)를 형성하는 단계이다. 세 번째 단계는 폴리머리제이션 단계(polymerization step)로서, 상기 어닐링 단계를 거친 시료를 적정 온도로 유지함으로써 상기 디엔에이-프라이머 복합체의 프라이머를 디엔에이 중합효소가 중합반응에 의해 연장(extension)함으로써 원래의 주형 디엔에이에 대하여 상보적인 서열을 가지는 새로운 단일가닥 디엔에이를 복제하는 단계이다. 이와 같은 세 가지 단계를 순차적으로 20 - 40 회 정도 반복하여 매 사이클마다 상기 두 개의 프라이머 사이의 염기서열이 복제되게 함으로써 수백만 배 또는 그 이상에 이르는 염기서열 증폭을 달성하게 된다.

<33>

상기 디내츄레이션 단계에서의 온도는 90℃에서 94℃ 범위의 값을 주로 사용하며, 상기 어닐링 단계에서의 온도는 사용된 프라이머의 녹는 점(T_m), 즉 T_m 값에 따라 적절하게 조절하는데, 통상적으로 40℃ 내지 60℃ 범위의 값을 사용한다. 폴리머리제이션 단계에서의 온도는 주로 사용하는 썬머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*)로부터 추출한 고온 안정성 Taq 디엔에이 중합효소(Taq DNA Polymerases)의 최적 활성 온도인 72℃로 맞추어, 3단계 온도 순환 사이클을 사용하는 것이 가장 보편적이며, Taq 디엔에이 중합효소의 활성 온도 범위가 상당히 넓으므로 상기 어닐링 단계와 폴리머리제이션 단계의 온도를 같게 하여 온도를 순환하는 2단계 온도 사이클도 사용하고 있다.

- <34> 상기 종래의 염기서열 증폭 방법은, 디엔에이 중합효소가 포함되어 있는 시료 전체의 온도를 3단계 또는 2단계 온도 순환 사이클에 따라 변화시키므로 다음과 같은 문제점이 존재한다.
- <35> 첫째, 종래의 염기서열 증폭 방법에서는 디엔에이 중합효소가 시료에 포함되어 있으므로 반응 종료 후 시료의 정제를 위하여 넣어 준 효소를 제거하는 과정이 간단하지 않으며 이미 사용한 효소를 다시 사용하기도 곤란하다.
- <36> 둘째, 종래의 염기서열 증폭 방법은 택 디엔에이 중합효소와 같은 고온 안정성을 가진 디엔에이 중합효소만을 사용할 수 있다. 종래의 염기서열 증폭 장치는 시료 전체를 고온으로 가열하는 공정을 포함하고 있기 때문이다.
- <37> 셋째, 종래의 온도 사이클형 염기서열 증폭 방법은 랩온어칩(Lab-on-a-chip)과 같은 복합장치로의 구현이 어렵다. 랩온어칩과 같은 복합장치는 다단계 반응 및 공정이 하나의 칩에서 동시 또는 연속적으로 수행될 수 있도록 구현된 소형화된 장치인데, 종래의 염기서열 증폭 방법은 시료 전체의 온도를 변화시키는 공정을 반드시 필요로 하므로 구성 및 공정 상의 복잡성으로 인하여 소형화에 불리한 방식이며, 또한 급격한 온도 변화가 바람직하지 않은 복합장치에서의 구현도 어렵다.

<38>

이러한 문제점들을 해결하기 위한 여러 가지 방안들 중의 하나가 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용하는 것이다. 고정화된 효소란 지지대에 물리적, 또는 화학적으로 결합된 상태로 존재하면서 촉매활성을 유지하고 있는 효소를 의미한다. 이러한 고정화된 효소를 사용함으로써 얻을 수 있는 일반적인 장점은, 첫째, 반응 후 효소가 고정된 지지대를 제거함으로써 효소를 간편하게 반응용액으로부터 분리, 회수할 수 있으므로 시료의 정제과정을 간단하게 할 수 있고, 둘째, 상기 회수된 고정화된 효소를 재사용 함으로써 비용을 절감할 수 있으며, 셋째, 효소반응이 포함된 다단계 공정들을 단순화할 수 있게 됨에 따라 반응공정상의 효율을 높일 수 있다는 점이다. 또한, 효소를 고정화시킴에 따라 효소의 물리적 안정성이 향상되거나, 효소반응의 조건이 변화되는 등의 부차적 효과에 의해 활용 효율이 향상될 수도 있다. 따라서, 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용함으로써, 종래의 염기서열 증폭 방법이 가지는 상기의 문제점들을 해결하는 것이 가능할 것으로 예상할 수 있다.

<39>

그러나, 아직 효소의 고정화를 통하여 상기 문제점들을 해결한 방법은 알려져 있지 않으며, 그 주요 원인은 고정화된 효소의 활성 문제와 이를 사용하는 공정상의 문제로 크게 나누어 볼 수 있다. 첫째, 효소를 고정화하기 위한 여러 가지 방법들이 보고되어 있으나, 중합효소 연쇄반응과 같이 실질적인 산물을 생성하고, 그 결과를 검출할 수 있을 정도의 높은 활성을 유지한 채로 고정화된 디엔에이 중합효소를 준비하는 방법은 보고된 바가 없다. 즉, 고정화된 디엔에이 중합효소를

사용한 염기서열 증폭 방법 및 장치를 구현하기 위해서는 활성을 높게 유지한 채로 디엔에이 중합효소를 고정할 수 있는 방법의 개발이 선행되어야 한다. 둘째, 활성이 높게 유지된 채 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용하더라도, 기존의 온도 순환 사이클을 거치는 방식으로는 큰 효과를 기대하기 어렵다. 우선, 종래의 온도 순환 사이클 방식은 시료 전체를 고온으로 가열하는 단계를 반드시 필요로 하므로 고온 안정성이 아닌 디엔에이 중합효소의 사용이 불가능하다는 한계를 가지고 있다. 또한, 종래의 온도 순환 사이클 방식에서는 폴리머리제이션 단계에 맞는 온도 순환 단계에서만 디엔에이 중합효소가 중합반응을 하게 구성되어 있어, 전체 반응 시간 중 일부의 시간에서만 디엔에이 중합반응이 실행되게 되어 염기서열 증폭반응의 시간적 효율이 온도 순환 사이클의 온도 변화 속도에 의하여 제한을 받게 된다. 따라서, 반응 시료 전체의 온도를 순차적으로 바꾸는 종래의 온도 순환 사이클 방식이 아닌, 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용하는 장점을 살릴 수 있는 새로운 염기서열 증폭 방법 및 장치의 개발이 필요하다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<40> 본 발명은 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 새로운 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

<41> 보다 구체적으로, 본 발명은 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용함으로써 염

기서열 증폭 후 디엔에이 중합효소의 분리 및 회수가 간편한 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공하는 것을 목적으로 한다. 이를 통하여 시료의 정제가 간편하고, 또한 디엔에이 중합효소의 재사용이 가능한 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공하고자 한다.

<42> 본 발명은 또한, 고온 안정성을 가진 디엔에이 중합효소 뿐만 아니라 고온 안정성이 아닌 디엔에이 중합효소의 사용도 가능한 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공하는 것을 목적으로 한다. 다양한 디엔에이 중합효소의 사용이 가능하게 함으로써 염기서열 증폭 방법 및 장치의 활용도를 확장할 수 있으며, 특히 고온 안정성이 아닌 디엔에이 중합효소의 사용을 가능하게 함으로써 디엔에이 중합반응에 의한 염기서열 복제의 정확도를 향상시킬 수 있는 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공하고자 한다.

<43> 그리고, 본 발명은 종래의 염기서열 증폭 방법 및 장치에서 사용되는 온도 변화 공정이 불필요한 방법 및 장치를 제공함으로써, 구성 및 공정이 보다 간단한 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법 및 장치를 사용하는 것을 목적으로 한다. 따라서, 본 발명은 종래의 염기서열 증폭 방법 및 장치에 비하여 장치의 소형화 및 랩온어칩과 같은 복합장치에서의 구현이 용이한 장치 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<44> 본 발명이 속한 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 명세서의 도면, 발명의 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 본 발명의 다른 목적 및 장점을 쉽게

인식할 수 있다.

【발명의 구성】

<45> 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 다음과 같은 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 새로운 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공한다.

<46> 보다 상세하게 본 발명은, 중합효소 연쇄반응에 의해 적어도 하나의 특정 디엔에이 염기서열을 증폭시키는 방법에 있어서,

<47> a) 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되기 위한 온도범위로 제 1 반응영역을 유지시키고,

<48> 단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적인 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되기 위한 온도범위로 제 2 반응영역을 유지시키고,

<49> 상기 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장산물이 디엔에이 중합반응에 의해 합성되기 위한 온도범위로 제 3 반응영역을 유지시키는 단계;

<50> b) 고정화된 디엔에이 중합효소를 상기 제 3 반응영역에 위치시키는 단계;
및

<51> c) 특정 디엔에이 염기서열이 증폭될 수 있도록 상기 제 1 반응영역, 상기 제 2 반응영역 및 상기 제 3 반응영역간에 디엔에이를 이동시키는 단계;를 포함하

며,

<52> 상기 디엔에이를 이동시키는 단계를 적어도 1 회 이상 반복하는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법을 제공한다.

<53> 본 발명은 또한, 중합효소 연쇄반응에 의해 적어도 하나의 특정 디엔에이 염기서열을 증폭시키는 장치에 있어서,

<54> a) 반응용기;

<55> b) 상기 반응용기의 제 1 반응영역을 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되기 위한 온도범위로 유지시키고,

<56> 상기 반응용기의 제 2 반응영역을 단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적인 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되기 위한 온도범위로 유지시키고,

<57> 상기 반응용기의 제 3 반응영역을 상기 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장산물이 디엔에이 중합반응에 의해 합성되기 위한 온도범위로 유지시키는 정온유지수단;

<58> c) 특정 디엔에이 염기서열이 증폭될 수 있도록 상기 제 1 반응영역, 상기 제 2 반응영역 및 상기 제 3 반응영역간에 디엔에이를 이동시키는 이동수단;를 포함하며,

<59> 상기 제 3 반응영역에는 고정화된 디엔에이 중합효소가 위치되고, 상기 이동

수단은 디엔에이를 적어도 1 회 이상 반복적으로 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 장치를 제공한다.

<60> 본 발명은 또한, 중합효소 연쇄반응에 의해 적어도 하나의 특정 디엔에이 염기서열을 증폭시키는 장치에 있어서,

<61> a) 반응용기;

<62> b) 상기 반응용기의 제 1 반응영역을 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되기 위한 온도범위로 유지시키고,

<63> 상기 반응용기의 제 2 반응영역을 단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적인 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되기 위한 온도범위로 유지시키고,

<64> 상기 반응용기의 제 3 반응영역을 상기 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장 산물이 디엔에이 중합반응에 의해 합성되기 위한 온도범위로 유지시키는 정온유지 수단을 포함하며,

<65> 상기 제 3 반응영역에는 고정화된 디엔에이 중합효소가 위치되고, 상기 제 1 영역, 제 2 영역, 및 제 3 영역 중 상대적으로 온도가 높은 영역은 상대적으로 온도가 낮은 영역보다 낮은 높이에 위치되고, 특정 디엔에이 염기서열이 증폭될 수 있도록 디엔에이를 열 대류에 의해 상기 제 1 영역, 제 2 영역, 및 제 3 영역간을 적어도 1 회 이상 반복적으로 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이

중합효소를 사용한 염기서열 증폭 장치를 제공한다.

<66>

본 발명에서 고정화된 디엔에이 중합효소라 함은 고체 상에 활성을 유지한 채 결합되어 있는 디엔에이 중합효소를 의미한다. 고정화된 디엔에이 중합효소를 제조하는 방법은 여러 가지가 있을 수 있으나, 중합효소 연쇄반응의 결과로 주형 디엔에이의 염기서열이 증폭되어 그 결과를 검출할 수 있을 정도로 활성이 높게 유지된 고정화된 디엔에이 중합효소를 제조할 수 있어야 한다. 본 발명에서는 디엔에이 중합효소의 활성부위를 디엔에이 기질로 마스킹하여 금 표면 위에 공유결합에 의해 고정화시키는 방법으로 활성이 높게 유지된 고정화된 디엔에이 중합효소를 제조하였다. 본 명세서의 실험 예에 그 구체적인 과정이 설명되어 있는데, 본 발명에서 실시한 결과, 고정화된 효소의 활성은 동량의 용액상 효소에 비하여 약 60 - 80%의 수준을 나타내어 중합효소 연쇄반응에 사용할 수 있을 정도의 충분한 활성을 나타내었다. 그러나, 본 발명에서 사용하는 고정화된 디엔에이 중합효소는 상기 방법에 의하여 고정화된 것에만 국한되는 것이 아니고 다른 방법으로 고정화된 디엔에이 중합효소라도 사용될 수 있다.

<67>

일반적으로 디엔에이 중합효소에 의한 염기서열 증폭 방법에 사용되는 시료는, 주형 디엔에이, 기질이 되는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 등 4종류의 삼인산화 데옥시뉴클레오타이드, 중합반응을 시작하기 위한 프라이머, 및 디엔에이 중합반응을 촉매하는 디엔에이 중합효소가 적절한 염 농도와 수소 이온 농도를 유지하도록 조

절된 완충용액에 포함된 상태로 구성되어 있다.

<68> 본 발명에 사용되는 시료의 구성은 기존의 염기서열 증폭 방법에 사용되는 시료와 차이를 보인다. 즉, 디엔에이 중합효소가 시료와 같은 수용액 상에 용해되어있는 종래의 염기서열 증폭 방법과는 달리, 본 발명에서는 고체 지지대에 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용하기 때문에 수용액 상의 시료에는 디엔에이 중합효소가 포함되어 있지 않다. 따라서 종래의 방법과 달리 반응이 종료된 후 효소의 분리 및 시료의 정제가 간편하고, 효소의 재 사용이 가능하도록 하는 장점을 얻을 수 있다.

<69> 본 발명에 사용되는 시료의 구성 중 주형 디엔에이는 단일가닥, 이중가닥, 및 부분적 이중가닥 어느 형태로 존재하여도 무방하며, 길이나 형태가 다른 여러 종류의 디엔에이가 혼합물 상태로 존재하여도 무방하다. 메신저알엔에이(messenger Ribonucleic Acid : mRNA)를 포함하는 시료에서 염기서열을 증폭하고자 할 때, 알엔에이(Ribonucleic Acid : RNA)를 디엔에이로 바꾸는 역전사 효소(Reverse-transcriptase)를 사용하는데, 이렇게 제조한 상보적 디엔이(Complementary Deoxyribonucleic Acid : cDNA)도 역시 주형으로 사용될 수 있다.

<70> 본 발명에서 프라이머는 증폭하고자 하는 특정 핵산 염기서열에 해당하는 디엔에이 이중 가닥의 5'-말단 일부분을 각각 포함하는 최소 한쌍의 올리고뉴클레오티드를 사용한다. 이들 프라이머 쌍은 각각 주형 디엔에이의 특정 염기서열의 3'-말단에 상보적으로 결합되어 디엔에이 중합반응이 시작될 수 있도록 하는 역할을 수행하도록 구성되어 있으며, 중합효소 반응을 연쇄적으로 진행시킬 경우 기질에

비해 과량의 몰비로 첨가한다. 주형 디엔에이의 특정 염기서열과 일부 변형된 염기서열을 증폭하고자 할 때, 프라이머가 주형 디엔에이에 결합될 수 있는 구조를 유지할 수 있도록 하는 범위 내에서, 프라이머 서열 내에 일부 치환 또는 첨가된 염기가 사용되어 주형 디엔에이와 부분적으로 상보적이지 않게 구성된 염기서열을 포함하고 있어도 프라이머로 사용이 가능함은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 명백하다.

<71> 본 발명의 구성상 가장 큰 특징은 시료 내에 각각 특정온도로 유지된 복수의 반응영역을 형성시키는 것과, 이들 반응영역들 간에 디엔에이가 순환되도록 한다는 것이다.

<72> 디엔에이 중합효소의 반응은 1) 시료에 포함된 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되는 디내츄레이션 단계; 2) 단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적인 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되는 어닐링 단계; 3) 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장산물이 합성되는 폴리머리제이션 단계로 구성되어 있고, 이들이 순차적이고 반복적으로 일어남으로써 염기서열이 증폭된다. 종래의 염기서열 증폭 방법에서는 시료 전체의 온도를 순차적으로 변화시키는 온도 사이클 방식에 의하여 상기 단계들이 진행되도록 하고 있다.

<73> 그러나, 본 발명에서는 상기 단계들이 수행될 수 있는 온도범위를 가진 복수의 반응영역을 형성시키고, 디엔에이를 상기 복수의 반응영역들 간에 순환시킴으로써 상기 단계들이 진행되도록 한다. 본 발명에서는 상기 복수의 반응영역으로, 1)

상기 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되기 위한 온도범위로 제 1 반응영역을 유지시키고, 2) 상기 단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적인 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되기 위한 온도범위로 제 2 반응영역을 유지시키고, 3) 상기 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장산물이 주형 디엔에이와 상보적인 염기서열을 가지게 복제되기 위한 온도범위로 제 3 반응영역을 유지시킨다. 상기 제 1 반응영역, 제 2 반응영역, 및 제 3 반응영역은 서로 전부 또는 일부가 겹칠 수 있으며, 또한 각각의 온도 범위도 일부 또는 전부가 겹칠 수 있다.

<74> 상기 디엔에이가 상기 제 1 반응영역에서 단일가닥으로 디내츄레이션되고, 상기 제 2 반응영역에서 프라이머와 어닐링되고, 상기 제 3 반응영역에 고정화된 디엔에이 중합효소를 위치시킴으로써 중합반응이 일어나게 함으로써 프라이머의 연장산물이 복제된다. 이 때 생성된 프라이머 연장산물의 염기서열은, 프라이머 구성 방법에 따라서 주형으로 사용된 디엔에이의 특정 염기서열과 동일하거나 일부 치환 또는 첨가된 염기서열을 가질 수 있다. 중합효소 연쇄반응이 일어나면, 처음 주형으로 사용된 디엔에이 외에 프라이머 연장산물 역시 주형으로 사용되어, 이후 동일한 염기서열을 가지는 프라이머 연장산물들이 증폭되게 된다.

<75> 본 발명에서는, 상기 제 1 반응영역, 상기 제 2 반응영역 및 상기 제 3 반응영역간에 디엔에이를 특정 염기서열이 증폭될 수 있도록 이동시킴으로써 디엔에이 염기서열의 증폭이 일어나게 한다. 상기 디엔에이에는 주형으로 사용된 디엔에이

외에, 상기 반응영역들간의 이동을 통하여 생성된 프라이머 연장 산물도 포함되어 있다. 상기 반응영역들간에 반복적으로 이동되는 것은 디엔에이들이며, 그 외의 완충제, 삼인산화데옥시리보뉴클레오타이드등을 포함한 시료는 각각의 반응영역들에 고정적으로 위치되고 있어도 무방하며 디엔에이들과 함께 반응영역들간에 이동되어도 된다. 상기 "디엔에이를 특정 염기서열이 증폭될 수 있도록 이동시킨다"는 것은, 중합효소 연쇄반응이 일어날 수 있도록 상기 3개의 반응영역들 사이로 적어도 한번 씩은 디엔에이를 이동시키는 것을 의미하는 것이다.

<76>

본 발명에서, 상기 고정화된 효소의 고정화되어지는 효소는 주형 디엔에이와 상보적인 서열을 복제하는 기능을 가진 대장균 디엔에이 중합효소 I, 대장균 디엔에이 중합효소 I의 클레나우 프래그먼트, T4 디엔에이 중합효소, 락 디엔에이 중합효소 및 이들의 유도체 및 변형체로 된 군에서 선택하여 사용한다.

<77>

종래의 온도 순환 사이클 방식에 의한 디엔에이 염기서열 증폭 방법 및 장치에서는 시료 전체를 고온으로 가열하는 단계를 포함하기 때문에, 중합반응에 사용되는 효소는 고온 안정성을 가진 것만이 실질적으로 사용되며, 고온 안정성을 가지지 못한 경우는 열에 의한 효소의 활성 손상으로 인해 매번의 온도 순환 사이클마다 효소를 첨가하여야 한다. 본 발명에서는 고정화된 디엔에이 중합효소를 특정 온도 범위의 영역(제 3 반응영역)에 위치시킴으로써 열에 의하여 디엔에이 중합효소가 손상되는 문제를 해결하였다. 즉, 본 발명에서는 90℃ 이상의 고온을 필요로 하는 디내추레이션 과정에 의하여 영향을 받지 않도록 폴리머리제이션이 일어나는 온

도범위를 갖는 반응영역에 효소를 위치시킴으로써, 디엔에이 중합효소가 고온 상태에 노출되지 않게 하여 고온 안정성을 가지지 않은 디엔에이 중합효소도 사용이 가능하게 하였다.

<78> 상술한 목적, 특징 및 장점들은 첨부된 도면과 관련한 다음의 상세한 설명을 통하여 보다 분명해 질 것이다. 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다. 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명한다.

<79> 도1은 본 발명에 의한 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법의 개념을 나타내는 구성도이다. 도1의 a)에서 보는 바와 같이, 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되기 위한 온도범위로 유지되는 제 1 반응영역(1), 단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적 서열을 갖는 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되기 위한 온도범위로 유지되는 제 2 반응영역(2), 상기 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장산물이 합성되기 위한 온도범위로 유지되는 제 3 반응영역(3)을 형성시키고, 고정화된 디엔에이 중합효소를 상기 제 3 반응영역(3)에 위치시킨 후, 상기 제 1 반응영역, 상기 제 2 반응영역 및 상기 제 3 반응영역 간에 디엔에이를 이동시키는 것이 본 발명의 구성이다. 본 발명은 각 반응영역들의 온도범위가 일부 중복이 되도록 하는 구성도 가능하며(도1의 b)), 상

기 반응영역들 간의 이동을 용이하게 하기 위하여 위치가 변경된 구성도 가능하다 (도1의 c)).

<80> 본 발명의 예로서, 고정화된 **택** 디엔에이 중합효소를 사용하는 경우를, 도1의 a를 참조하여 보다 구체적으로 작동 상태를 예시하면 다음과 같다.

<81> 디내츄레이션이 일어나도록 90~94℃의 온도범위로 유지시키는 제 1 반응영역을 가장 낮은 높이에 위치시키고, 프라이머의 어닐링이 일어나도록 40~60℃의 온도범위로 유지시키는 제 2 반응영역을 가장 높은 높이에 위치시키며, 그 사이에 예를 들어 **택** 디엔에이 중합효소의 활성 최적온도인 72℃의 온도범위로 유지시키는 제 3 반응영역을 가운데에 위치시킨다. 상기와 같이 반응영역을 구성하는 경우, 상대적으로 온도가 높은 영역이 상대적으로 온도가 낮은 영역보다 낮은 높이에 위치되게 하므로, 디엔에이의 이동은 온도 기울기에 의한 열 대류에 의해 달성될 수 있다.

<82> 즉, 상기 제 1 반응영역(1)에서 상기 디내츄레이션 단계가 일차적으로 일어나고, 디내츄레이션된 디엔에이가 프라이머 존재 하에서 열 대류에 의해 상기 제 2 반응영역(2)으로 이동함으로써 어닐링 단계가 이차적으로 일어나게 되며, 어닐링에 의해 생성된 디엔에이-프라이머 복합체가 열 대류에 의해서 제 3 반응영역(3)을 통과하는 과정 중에 마지막으로 상기 폴리머리제이션 단계가 제 3 반응영역에 위치시킨 고정화된 디엔에이 중합효소(4)에 의하여 일어나게 되며, 이에 따라 상기 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션의 중합효소 반응의 3개 단계가 순차적으로, 그

리고 반복적으로 일어나게 되어 시료 디엔에이의 특정 부위 염기서열의 증폭을 효율적으로 달성하게 된다.

<83> 택 디엔에이 중합효소를 사용하는 본 발명의 또 다른 예를 도1의 b)를 참조하여 설명하면 다음과 같다. 택 디엔에이 중합효소는 72℃에서 최적 활성도를 가지고 있으나, 낮은 온도 영역까지 넓은 활성도를 가지는 것으로 알려져 있다. 따라서, 택 디엔에이 중합효소를 사용하는 경우에는 도1의 b)와 같이 중합반응이 일어나는 온도범위를 어닐링이 일어나는 온도 범위와 같도록 하여, 제 2 반응영역과 제 3 반응영역을 동일한 위치에 둘 수도 있다. 이 경우에도 디엔에이의 이동은 온도 기울기에 의한 열 대류에 의해 달성될 수 있다.

<84> 본 발명의 또 다른 예로서, 고정화된 대장균 디엔에이 중합효소를 사용하는 경우를 도1의 c)를 참조하여 설명하면 다음과 같다. 대장균 디엔에이 중합효소의 최적온도는 37℃로서 프라이머의 어닐링이 일어나는 온도범위보다 더 낮다. 따라서 대장균 디엔에이 중합효소를 사용하는 경우에는 도1의 c와 같이 중합반응이 일어나는 제 3 반응영역이 어닐링이 일어나는 제 2 반응영역보다 높은 위치가 되도록 구성하는 것이 바람직할 것이다. 이 경우에도 디엔에이의 이동은 온도 기울기에 의한 열 대류에 의해 달성될 수 있다.

<85> 도 1의 a), b), c)에 예시한 본 발명의 예들에서 특정 온도범위를 가지는 반응영역들(1, 2, 3)의 온도 배치가 열 대류의 형성에 적합하지 않은 경우 디엔에이의 이동을 일어나게 하는 수단을 부가적으로 사용할 수 있을 것이다.

<86>

도2a는 본 발명의 실시예의 하나로서, 본 명세서의 실험 예에서 사용된 구성이다. 본 구성에서는 열 대류에 의하여 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하며, 상대적으로 온도가 높은 영역이 상대적으로 온도가 낮은 영역보다 낮은 높이에 위치시키되, 제 2 반응영역과 제 3 반응영역이 일부 겹치게 되는 예이다.

<87>

도2b 및 도2c에 도시한 바와 같이, 아래쪽 제 1 전도성 블록(101)을 고온으로 유지시키고, 위쪽 제 2 전도성 블록(102)을 저온으로 유지시킨 후, 이 전도성 블록(101, 102)들을 단열재(107)에 의해 단열시키면, 반응용기(103) 내에 고온인 제 1 반응영역(1) 및 저온인 제 2 반응영역(2), 그리고 이들 사이의 온도 기울기로 인한 제 3 반응영역(3)이 형성된다. 이때, 고온 영역에서의 시료는 저온 영역의 시료에 비하여 상대적으로 낮은 밀도를 가지게 되므로, 낮은 높이에 위치한 고온 영역에서 높은 높이에 위치한 저온 영역으로의 부력에 의한 디엔에이의 이동이 생기고, 중력의 영향으로 반대 방향으로의 디엔에이의 이동이 유발됨으로써, 온도차에 의한 자연적인 열 대류에 의해 특정 온도범위의 복수의 반응영역(1, 2, 3)간의 디엔에이의 순환이 자연적으로 일어나게 된다. 상기 제 1 전도성 블록(101)을 고온으로 유지시키는 가열장치(104)를 블록으로만 도시하고, 상기 제 2 전도성 블록(102)을 저온으로 유지시키는 순환형 항온수조는 도시하지 않았지만, 그 구체적인 구성들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 예측될 수 있다. 본 발명의 제 1 반응영역, 제 2 반응영역, 및 제 3 반응영역을 특정의 온도범위로 유지시키는 정온유지수단으로써, 본 실시 예에서는 전도성 블록(1,

2), 가열장치, 순환형 항온수조를 사용하고 있다. 그러나, 본 발명의 정온 유지 수단은 전도성 블록(1,2), 가열장치, 순환형 항온수조들로 이루어진 구성에만 한정되는 것은 아니며, 예를 들면, 전도성 블록을 사용하지 않고 액체나 기체와 같은 적정온도의 유체가 반응용기의 특정 부위와 접촉하게 하거나, 또는 적외선 발생장치를 이용하여 시료를 직접 가열하는 방식 등으로 반응영역들을 형성시키는 구성도 가능하다. 정온 유지 수단의 구체적인 구성은 산업현실에 따라 다양하게 변형될 수 있으며, 그 어떠한 변형이라도 제 1, 2, 및 3 반응영역을 특정의 온도범위로 유지시키는 기능을 하는 구성이라면 본 발명의 범위에 당연히 속한다 할 것이다.

<88> 도3a 및 3b는 본 발명의 또 다른 실시 예들로서, 본 실시 예들에서는 전기장을 사용하여 디엔에이를 이동시킨다.

<89> 디엔에이는 그 구조 내에 전하를 가지는 여러 기능기를 포함하고 있으나, 전체적인 구성으로 보면 각 단위 뉴클레오티드 당 세 개씩 포함된 인산기가 미치는 영향이 가장 커서, 중성에 가깝도록 유지된 완충액 내에서 다량의 음전하를 띠게 된다. 따라서 도3a 및 도3b에서 제시한 구성도와 같이, 반응용액의 양쪽 말단 영역(1, 3)에 각각 전극(7, 7')을 도입시킨 후, 구형파 발생기(6)를 사용하여 반응 시료내에 전위차를 형성시키고 이 전위차의 방향을 주기적으로 바꾸어 줌으로써, 음전하를 띤 디엔에이가 상기 각 반응영역들(1, 2, 3)간에 순차적으로 이동되어 순환되도록 함으로써, 염기서열이 증폭되도록 한다. 도 3a 및 도 3b에는 도시되어 있지 않지만, 상기 반응영역들(1, 2, 3) 각각에 전극을 도입하거나, 상기 반응영역들(1,

2, 3)의 배치를 변형한 구성도 가능하다.

<90>

디엔에이 중합반응 과정에서 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션이 일어나는 궁극적인 대상은 기질로 사용되는 디엔에이이므로, 각 반응영역들 간에 이동시켜야 하는 대상물질은 디엔에이들이다. 그런데, 디엔에이들을 이동시키기 위하여 전기장을 걸어주었을 때, 시료 내에 포함되어 있는 프라이머들과 삼인산화데옥시리보뉴클레오타이드의 이동이 동시에 일어날 수 있으며, 이 경우에도 기질이 각각의 해당 반응영역에 높은 농도로 밀집되는 것이므로 디엔에이의 어닐링 및 폴리머리제이션이 보다 용이하게 일어날 수 있는 유리한 조건을 제공하게 된다. 시료 내에 형성시키는 전기장의 세기와 유지시간은 디엔에이의 크기와 반응용기의 형상에 따라 조절할 수 있으며, 중합효소를 금속표면에 고정화시킨 경우에는 고정화된 디엔에이 중합효소를 전극으로 사용할 수 있을 것이다. 반응 공정, 시료의 특성 및 반응용기의 형태에 따라 구성을 변화시키는 것이 가능하며, 이는 도시된 도3a 및 도3b의 예에 국한되지 않는다.

<91>

도4는 본 발명의 또 다른 실시 예로서, 디엔에이를 이동시키는 단계는 압력차 발생수단에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법의 구성도이다.

<92>

도4에서 예시한 구성도와 같이 반응용기(5) 내의 한쪽 말단에 가하는 압력을 다른 쪽 말단에 비하여 높게 또는 낮게 하여 압력차를 발생시켜, 특정온도범위로 유지시킨 반응영역들(1, 2, 3)간에 디엔에이가 이동하게 할 수 있다. 도4에서는 피

스톤(8, 8')의 왕복운동을 이용하는 경우를 특정하여 예시하고 있으나, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 압력차 발생수단으로써 상기 피스톤(8, 8') 외에도 압력차를 발생시킬 수 있는 다양한 종류의 액체 또는 기체 펌프를 사용하는 것이 가능함은 주지의 사실이다.

<93> 도5는 본 발명의 또 다른 실시 예로서, 상기 디엔에이를 이동시키는 단계는 교반 수단에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법의 구성도이다.

<94> 도5에서 예시한 구성도와 같이 반응용기(5) 내에 넣은 자석 막대(9)를 전자석형 교반 구동장치(10)로 회전시킴으로써 디엔에이를 이동시킬 수 있다. 이외에도 날개형 교반기를 사용하거나, 용액과 접촉되는 얇은 막을 주기적으로 진동시키는 방법 등의 교반 수단에 의해 디엔에이를 반응영역들 간에 이동시킴으로써 본 발명의 목적을 달성할 수 있다.

<95> <실험 예>

<96> A. 고정화된 디엔에이 중합효소의 제조

<97> 아래에 도시된 65개 염기의 단일가닥 디엔에이와 KS 프라이머를 1:1 몰비로

넣은 pH 8.3의 인산염 완충용액을 94℃에서 10분 동안 방치한 후, 35℃ 이하가 될 때까지 느린 속도로 냉각시킨다. 이때 65개 염기의 단일가닥 디엔에이와 KS 프라이머가 어닐링되어 부분적으로 이중가닥이 된 디엔에이가 생성되게 된다. 이 용액에 적정 몰수의 **텍** 디엔에이 중합효소(AmpliTaq Gold, Perkin Elmer사, 미국)를 넣고, 72℃ 건조욕(dry bath)에서 10 분 동안 방치한 후 50℃ 건조욕으로 옮겨서, 디엔에이 중합효소의 활성부위에 상기 부분적 이중가닥 디엔에이가 결합되어 마스킹된 디엔에이 중합효소 용액을 제조하였다.

<98> KS 프라이머 : 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3'

<99> 65-mer :

<100> 3'-CCAGCTGCCATAGCTATTTTCTTTTCTTTCTTAAGTTCTTTTCTTTTCCTAGGTGATCAAGATCT-5'

<101> 표면에 밀집하여 고정화되는 디엔에이 중합효소의 최대량이 0.26 pmol이 되도록, 4.7 cm 길이의 지름 0.1 mm인 금 와이어(gold wire)를 외경 1.5 mm, 길이 약 4 mm의 나선형이 되도록 준비하였다. 표면 세척을 위하여 반응 직전에 60~70℃로 조절한 피란하(Piranha) 용액에 10~15 분 동안 넣어 두었다가, 탈이온수에 이어서 절대 에탄올로 세척하였다.

<102> 금 표면에 고정화 반응성 작용기를 도입하기 위하여 티올기를 가지고 있는 연결물질과 금 사이에서 일어나는 티올레이트 형성 반응, 즉 Au-S 결합 형성반응을 이용하여 금 표면에 티올 분자 단층막을 도입하여 지지대를 형성시켰다. 이때 고정화 반응성 작용기와 비반응성 말단기를 가지는 2가지 티올 분자가 혼합된 용액을 사용하여, 고정화 반응성 작용기를 가지는 티올 분자의 몰분율이 5%가 되도록 조절

하였다. 고정화 반응성 작용기로서 카르복실기를 도입하기 위하여 알킬 사슬의 길이가 상대적으로 긴 티올 분자인 12-머캅토도데칸산을 연결물질로 사용하였고, 비반응성 말단기를 가지는 티올 분자인 6-머캅토-1-헥산을 또는 1-헵탄티올을 매트릭스 물질로 사용하였다. 총 티올 분자 농도 2 mM의 에탄올 용액 100 μ l에 금 와이어를 넣고 상온에서 2 시간 동안 반응시킨 후, 금 와이어를 건져내어 절대 에탄올로 세척함으로써, 금 와이어 표면에 카르복실기를 도입하였다.

<103> 카르복실기가 도입된 금 와이어를 10 mM의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC)와 5 mM의 N-히드록시숙신이미드(NHS)를 포함하는 에탄올 용액 120 μ l에 넣어 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 상기 카르복실기는 카르보디이미드의 존재 하에서 N-히드록시숙신이미드와 반응하여 NHS-에스테르를 형성함으로써 활성화된다.

<104> 티올 분자 단층막의 카르복실기를 활성화시킨 후 금 와이어를 건져내어 상기 디엔에이 중합효소의 활성부위를 마스킹한 효소용액에 넣고 반응시켰다. 이 때, 티올 분자 단층막의 활성화된 카르복실기(NHS-에스테르)와 단백질의 일차 아민기와의 반응에 의하여 아미드 결합($-CO-NH-$)이 형성되어, 텍 디엔에이 중합효소가 지지대에 고정화된다.

<105> 상기의 방법으로 제조된 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용하여 기존의 온도 순환 사이클에 의한 중합효소 연쇄반응을 실시하였을 때, 수용액상의 효소를 사용하였을 때에 비하여 60~80%의 활성을 보였다.

<106>

B. 반응 시료의 준비

<107>

반응용기로서 한쪽이 막힌 유리관을 사용하였으며, 유리관의 길이는 55~60 mm이고, 내경은 2 mm이고, 외경이 8 mm이며, 막힌 쪽 바닥 면의 유리 두께는 약 3 mm이다. 유리관 내벽은 스프레이 방식의 폴리 테트라 플루오로 에틸렌 (Polytetrafluoroethylene) 코팅제로 코팅하고 열경화시켜 표면 처리하여 사용하였다.

<108>

pBluescript II KS(+)를 주형 디엔에이로 사용하여 그 중 T7 프로모터 부위 627번 뉴클레오티드에서부터 T3 프로모터 부위 790번 뉴클레오티드까지 164 bp의 염기서열을 증폭하고자 하였다. 중합효소 연쇄반응에 사용된 시료는 주형 디엔에이가 40 ng, T3 프라이머(5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3') 및 T7 프라이머(5'-AATACGACTCACTATAG-3')가 각각 40 pmol씩 포함되어 있고, 4 nmol의 삼인산화데옥시 리보뉴클레오티드 혼합물질, 그리고 250 nmol 염화마그네슘, 50 mM의 염화칼륨이 포함된 전체 부피 100 μ l인 pH 8.3의 10 mM 트리스 완충용액이 되도록 준비하였다. 이 준비된 시료를 반응용기에 담고, 상기 A단계에서 준비한 금 와이어에 고정화된 λ 디엔에이 중합효소를 저온영역에 위치시켜서 반응에 사용하였다. 디엔에이 중합효소의 고정화된 후의 효소 활성을 측정하기 위한 대조군으로 동일한 방법으로 준비한 시료에 용액상태의 0.26 pmol의 λ 디엔에이 중합효소를 넣은 시료를 사용하여 온도 순환 사이클 방식에 의한 중합효소 연쇄반응을 실시하였다.

<109>

C. 디엔에이 중합반응의 실시

<110>

도 2b, 2c를 참조하여 설명하겠다. 먼저 아래쪽 제 1 전도성 블록(101)은 전열 방식 가열 장치를 가열하여 96℃로 유지하였고, 위쪽 제 2 전도성 블록(102)은 순환형 항온 수조를 사용하여 45℃로 고정하였다. 반응용기 내에 상기 B단계의 방법으로 준비한 시료를 주입하여 수용부(111, 117, 112)에 끼워 넣고, 반응 용기 내의 각 영역에서 온도 변화를 측정한 결과, 디내츄레이션이 일어날 수 있도록 90℃ 이상이 유지되는 고온 영역, 어닐링이 일어날 수 있도록 약 50℃ 정도로 유지되는 저온 영역, 그리고, 그 사이에서 열 대류가 일어날 수 있도록 온도 기울기가 형성되는 대류 영역이 형성됨을 확인할 수 있었다(도6). 따라서, 폴리머리제이션은 상기 저온 영역 및 대류 영역의 상충부에서 일어나게 될 것으로 예상할 수 있다.

<111>

중합반응을 실시하기 위하여, 디엔에이 중합효소가 고정화된 나선형 금 와이어(외경 1.5mm, 길이 4mm)의 중심이 상기 반응용기내 온도가 약 55℃인 영역에 위치되게 한 후, 상기 반응 조건에서 시료를 일정한 반응시간 동안 그대로 방치해 두었다. 반응용기를 꺼내어 식힌 다음, 반응 생성물을 1.0% 아가로즈 젤(agarose gel) 전기영동법을 사용하여 전개하고, 에티뮴 브로마이드 염료로 착색시키고, UV 조사시 나타나는 형광으로 디엔에이 생성물을 가시화한 후 이를 덴시토미터(densitometer)로 정량하였다. 도7은 반응시간을 30분 간격으로 4시간까지 변화시키면서 얻은 결과를 보여주는 전기 영동사진이다. 반응 생성물은 164 bp의 이중나선 디엔에이이다. 도7에서 알 수 있듯이, 반응시간 120분 부터 중합효소 연쇄반응

이 포화되기 시작했음을 알 수 있다.

<112> 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시 예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것이 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것이 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 명백하다. 그 때문에, 전술한 실시 예와 도면들은 모든 점에서 단순한 예시에 지나지 않으며, 한정적으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 범위는 특허청구범위에 의해서 나타나는 것으로써, 명세서 본문에 의해서는 아무런 구속도 되지 않는다.

【발명의 효과】

<113> 본 발명에 따르면 다음과 같은 효과가 있다.

<114> 첫째, 본 발명은 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용함으로써, 효소의 반복 사용이 가능하고, 연속되는 공정에서 효소를 제거하는 과정을 간편하게 할 수 있도록 하여, 비용을 절감하고 공정을 간소화할 수 있다.

<115> 둘째, 본 발명은 클레나우 프래그먼트(Klenow fragment), T7 디엔에이 중합효소 등 고온 안정성이 없는 디엔에이 중합효소들도 염기서열 증폭 방법 및 장치에

서 사용할 수 있도록 함으로써, 염기서열 증폭 방법 및 장치의 활용도를 확장할 수 있게 한다. 특히, 고온 안정성이 아닌 디엔에이 중합효소의 사용을 가능하게 함으로써 염기서열을 복제하는 중합반응의 정확도를 향상시킬 수 있는 방안을 제공한다.

<116>

셋째, 본 발명은 종래의 방법 및 장치에서 사용되는 온도 변화 공정이 불필요한 염기서열 방법 및 장치를 제공함으로써, 그 구성 및 공정이 보다 간단하게 되어 소형화 및 복합장치에서의 구현이 용이한 방안을 제공한다. 또한, 이에 따라 연속적인 중합반응이 가능하게 함으로써, 염기서열 증폭 속도를 향상시키는 것이 가능한 방안을 제공한다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

중합효소 연쇄반응에 의해 적어도 하나의 특정 디엔에이 염기서열을 증폭시키는 방법에 있어서,

a) 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되기 위한 온도범위로 제 1 반응영역을 유지시키고,

단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적인 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되기 위한 온도범위로 제 2 반응영역을 유지시키고,

상기 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장산물이 디엔에이 중합반응에 의해 합성되기 위한 온도범위로 제 3 반응영역을 유지시키는 단계;

b) 고정화된 디엔에이 중합효소를 상기 제 3 반응영역에 위치시키는 단계; 및

c) 특정 디엔에이 염기서열이 증폭될 수 있도록 상기 제 1 반응영역, 상기 제 2 반응영역 및 상기 제 3 반응영역간에 디엔에이를 이동시키는 단계;를 포함하며,

상기 디엔에이를 이동시키는 단계를 적어도 1 회 이상 반복하는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 고정화된 디엔에이 중합효소의 고정화되는 효소는 주형 디엔에이와 상보적인 서열을 복제하는 기능을 가진 대장균 디엔에이 중합효소 I, 대장균 디엔에이 중합효소 I의 클레나우 프래그먼트, T4 디엔에이 중합효소, ~~텍~~ 디엔에이 중합효소 및 이들의 유도체 및 변형체로 된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 디엔에이를 이동시키는 단계는 상기 제 1 영역, 제 2 영역, 및 제 3 영역 중 상대적으로 온도가 높은 영역을 상대적으로 온도가 낮은 영역보다 낮은 높이에 위치시킴으로써, 열대류에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 디엔에이를 이동시키는 단계는 전기장 발생수단에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 디엔에이를 이동시키는 단계는 압력차 발생수단에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 디엔에이를 이동시키는 단계는 교반 수단에 의해 디엔에이를 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 방법.

【청구항 7】

중합효소 연쇄반응에 의해 적어도 하나의 특정 디엔에이 염기서열을 증폭시키는 장치에 있어서,

a) 반응용기;

b) 상기 반응용기의 제 1 반응영역을 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되기 위한 온도범위로 유지시키고,

상기 반응용기의 제 2 반응영역을 단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적인 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되기 위한 온도범위로 유지시키고,

상기 반응용기의 제 3 반응영역을 상기 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장 산물이 디엔에이 중합반응에 의해 합성되기 위한 온도범위로 유지시키는 정온유지 수단;

c) 특정 디엔에이 염기서열이 증폭될 수 있도록 상기 제 1 반응영역, 상기 제 2 반응영역 및 상기 제 3 반응영역간에 디엔에이를 이동시키는 이동수단;를 포함하며,

상기 제 3 반응영역에는 고정화된 디엔에이 중합효소가 위치되고, 상기 이동수단은 디엔에이를 적어도 1 회 이상 반복적으로 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 장치.

【청구항 8】

중합효소 연쇄반응에 의해 적어도 하나의 특정 디엔에이 염기서열을 증폭시키는 장치에 있어서,

a) 반응용기;

b) 상기 반응용기의 제 1 반응영역을 디엔에이의 이중가닥이 각각 단일가닥 디엔에이 분자로 분리되기 위한 온도범위로 유지시키고,

상기 반응용기의 제 2 반응영역을 단일가닥 디엔에이 분자의 특정 부위에 상보적인 프라이머가 결합되어 부분적 이중가닥이 형성되기 위한 온도범위로 유지시키고,

상기 반응용기의 제 3 반응영역을 상기 부분적 이중가닥에서 프라이머 연장 산물이 디엔에이 중합반응에 의해 합성되기 위한 온도범위로 유지시키는 정온유지 수단;을 포함하며,

상기 제 3 반응영역에는 고정화된 디엔에이 중합효소가 위치되고, 상기 제 1 영역, 제 2 영역, 및 제 3 영역 중 상대적으로 온도가 높은 영역은 상대적으로 온도가 낮은 영역보다 낮은 높이에 위치되고, 특정 디엔에이 염기서열이 증폭될 수 있도록 디엔에이를 열 대류에 의해 상기 제 1 영역, 제 2 영역, 및 제 3 영역간을 적어도 1 회 이상 반복적으로 이동시키는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 장치.

【청구항 9】

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 고정화된 디엔에이 중합효소의 고정화 되는 효소는 주형 디엔에이와 상보적인 서열을 복제하는 기능을 가진 대장균 디엔에이 중합효소 I, 대장균 디엔에이 중합효소 I의 클레나우 프래그먼트, T4 디엔에이 중합효소, 태크 디엔에이 중합효소 및 이들의 유도체 및 변형체로 된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 장치.

【청구항 10】

제 7 항에 있어서, 상기 이동수단은 전기장 발생수단인 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 장치.

【청구항 11】

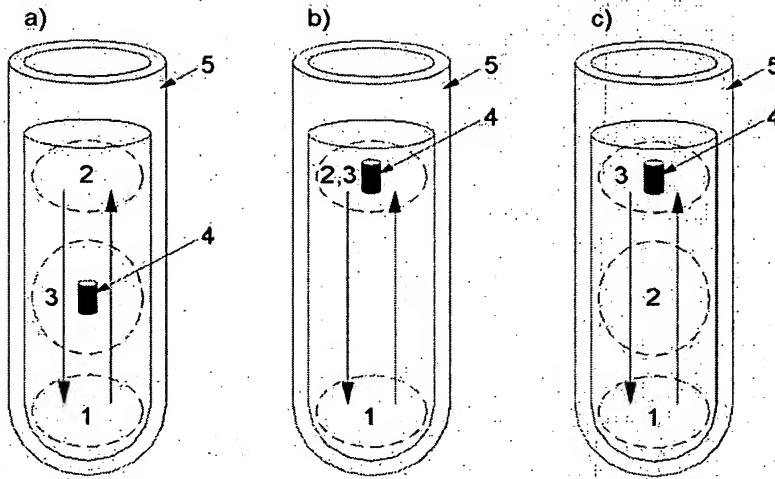
제 7 항에 있어서, 상기 이동수단은 압력차 발생수단인 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 장치.

【청구항 12】

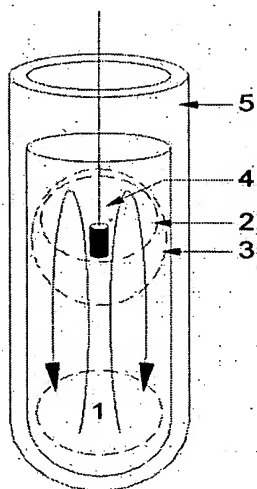
제 7 항에 있어서, 상기 이동수단은 교반 수단인 것을 특징으로 하는 고정화된 디엔에이 중합효소를 사용한 염기서열 증폭 장치.

【도면】

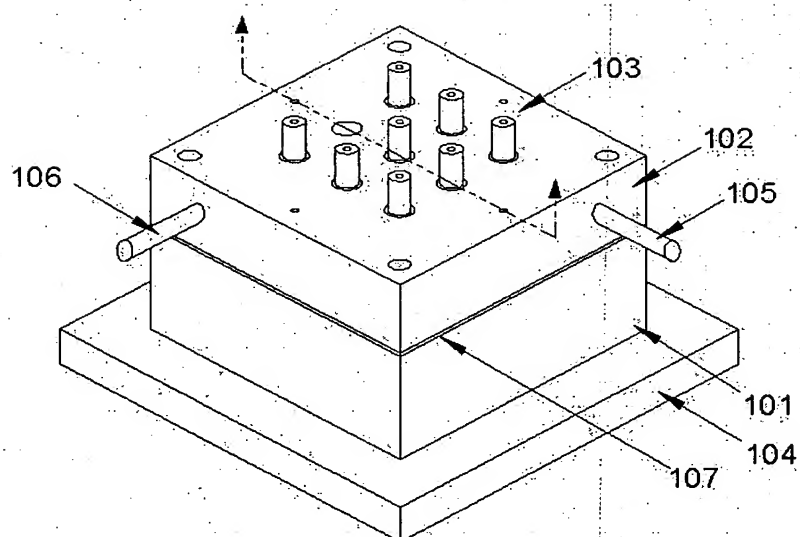
【도 1】



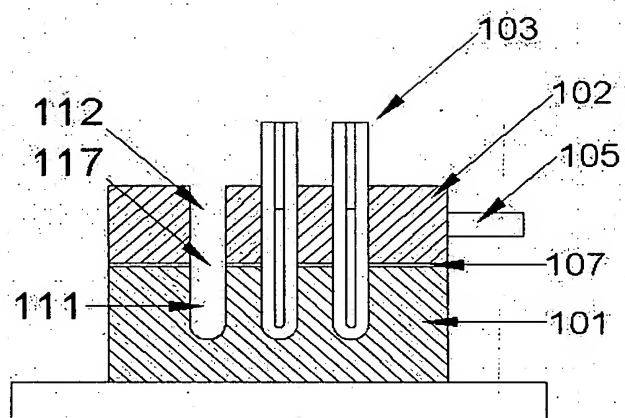
【도 2a】



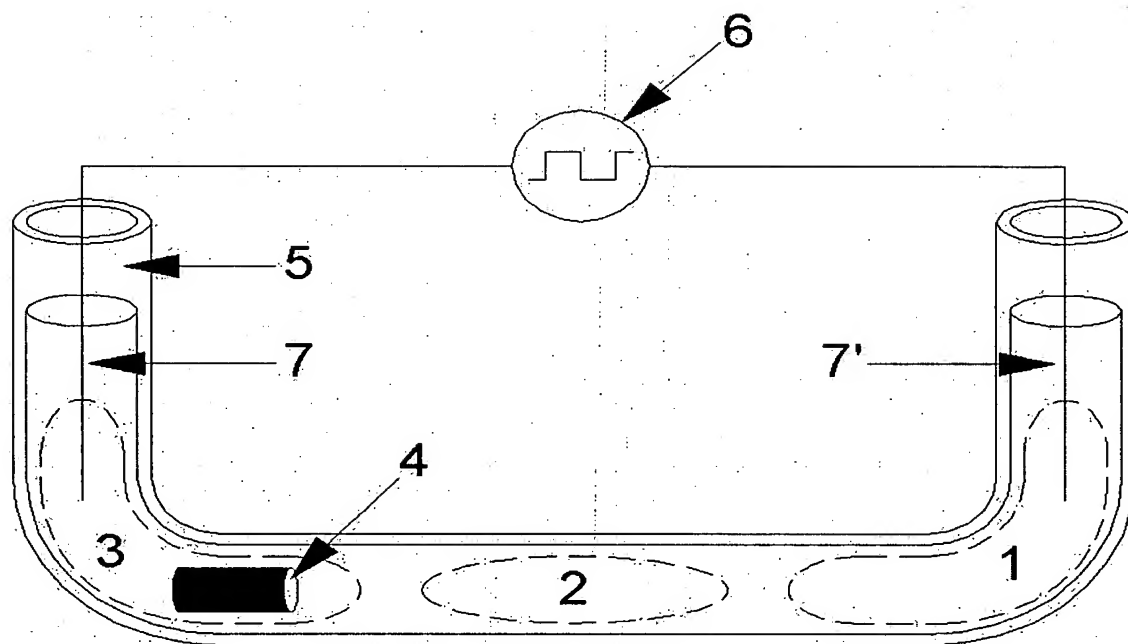
【도 2b】



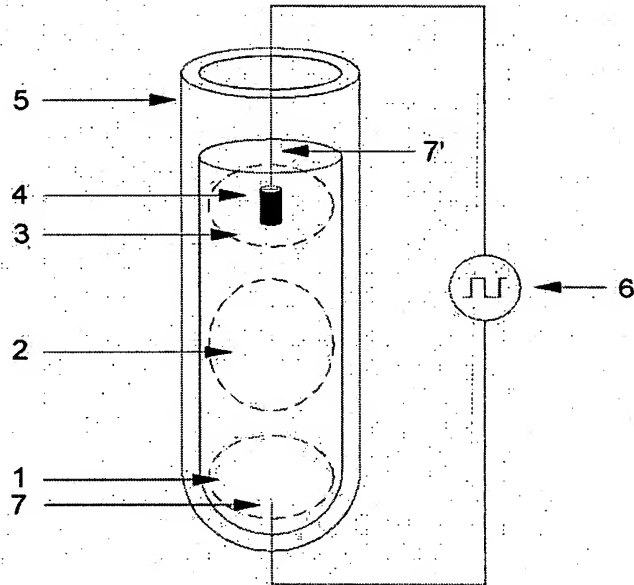
【도 2c】



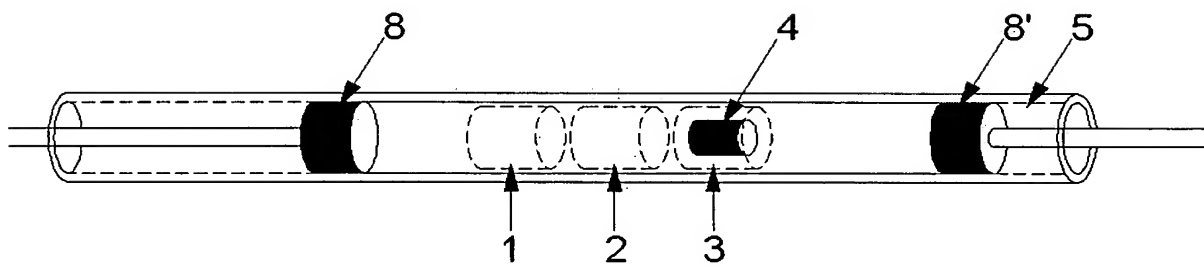
【도 3a】



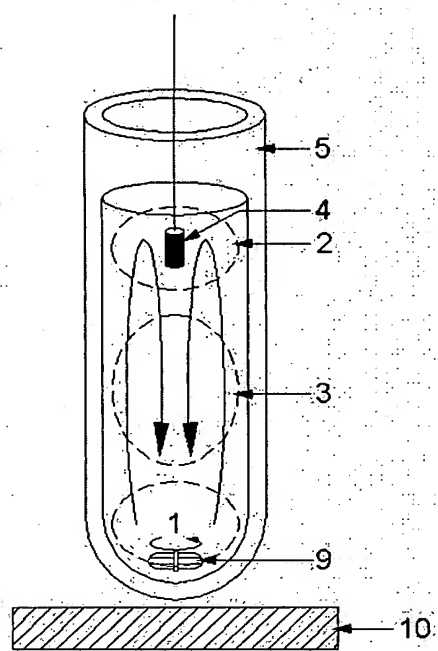
【도 3b】



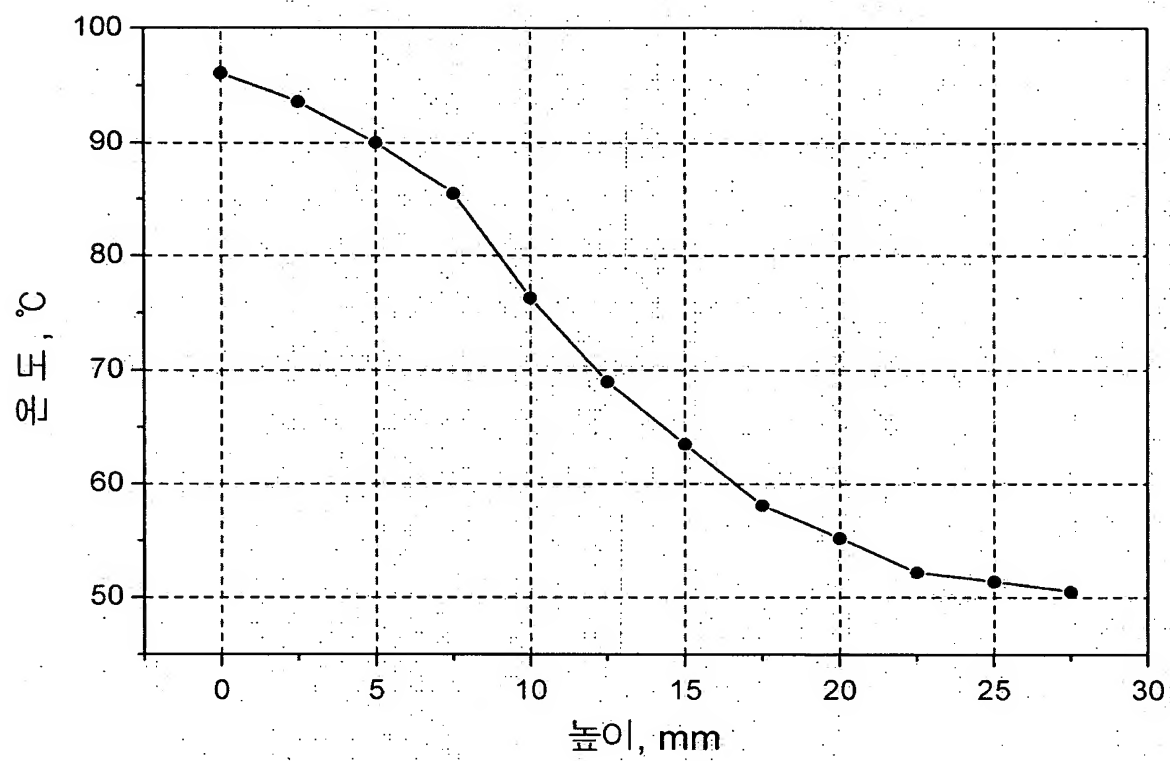
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【도 7】

